

PRISCILA GRITTEN SIEBEN

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE CASCAS DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP
(LAURACEAE), DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE FORMAS
FARMACÊUTICAS PARA USO TÓPICO**

CURITIBA

2012

PRISCILA GRITTEN SIEBEN

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE CASCAS DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP
(LAURACEAE), DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE FORMAS
FARMACÊUTICAS PARA USO TÓPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima
Co-orientador: Prof. Dr. Itamar Francisco Andreazza

CURITIBA

2012

Sieben, Priscila Gritten

Composição fitoquímica de cascas de *Persea major* (MEISN.) L. E. KOPP (Lauraceae), desenvolvimento e avaliação preliminar de formas farmacêuticas para uso tópico / Tomoe Nakashima – Curitiba, 2012.
90 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Lauraceae. 2. *Persea major*. 3. Cicatrização. 4. Polissacarídeos.
5. Formulações de uso tópico. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.32

**Dedico esse trabalho a todos que
buscam pelo conhecimento em
todos os âmbitos da vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos, conquistas e oportunidades de crescimento pessoal concedidas por todos esses anos.

Agradeço aos meus pais Jovenil Gritten Sieben e Terezinha de Jesus Meira, familiares, amigos, ao meu namorado Heitor Subtil Apolinario, e todos os que me acompanharam durante essa etapa, com apoio, conselhos e carinho, sempre.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao REUNI, pela oportunidade de aprendizado e apoio financeiro.

Agradeço aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima e Prof. Dr. Itamar F. Andreazza, por todo auxílio, conselhos e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, coordenador e membro docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, UFPR, pelas análises e oportunidade.

Ao Prof. Antônio Waldir Cunha da Silva, do Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, por todo apoio e auxílio.

Aos Professores: Dr^a. Mayumi Elisa O. Sato, Dr^a. Tânia Maria Bordin Bonfim, Dr. José Domingos Fontana, Dr. Cid Ambiré Santos e Dr. Brás Heleno de Oliveira, por toda ajuda e empréstimos.

À farmacêutica Maria da Graça T. Toledo, responsável pelo laboratório Central Analítica do Departamento de Farmácia da UFPR, pelo auxílio.

Ao técnico Jair José de Lima, do Departamento de Nutrição da UFPR, pelo suporte nas liofilizações e pronto atendimento sempre.

Aos meus colegas do laboratório de Fitoquímica: Ana Carolina Pareja, Grazielle Mancarz, Mariah Baril, Rodrigo Damian, Stella Ló, a todos os estagiários e ICs, professores e, em especial às amigas Bárbara Moriel e Sayonara Mendes Silva por todas as conversas, idéias, auxílio e suporte sempre que necessário.

Aos meus colegas de mestrado, companheiros de jornada, por todas as conversas e inspiração.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Programa de Pós-Graduação em de Ciências-Bioquímica, da UFPR, pelo apoio e troca de conhecimentos.

**“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”**

Carlos Drummond de Andrade

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

Dalai Lama

RESUMO

A família Lauraceae é composta de 52 gêneros e cerca de 3000 espécies, sendo a maioria dessas, lenhosas. As cascas do lenho de *Persea major* (Meisn.) L.E.Kopp, são usadas pela população em lesões, inflamações cutâneas e distúrbios gástricos, apresentando caráter mucilaginoso e ação cicatrizante. Poucos estudos existem na identificação química e aplicação cutânea da espécie, conhecida popularmente como pau-andrade e abacate-bravo, entre outros. Essa pesquisa focou-se na identificação da composição glicídica e fenólica de cascas da espécie; envolvidas na cicatrização; em conjunto com o desenvolvimento e avaliação preliminar de diferentes formulações para uso tópico com incorporação do extrato liofilizado. Foram detectados, na casca do lenho seca e estabilizada, aminogrupos, esteróides/triterpenos, taninos, saponinas e açúcares totais. Em relação à composição fenólica, o resultado obtido foi de 1,27 g%. Na determinação de taninos totais obteve-se a concentração de 3,41 g% utilizando o reagente Folin-Denis, e 0,66 g% com o reativo Folin-Ciocalteu; ambos expressos em equivalentes de pirogallol; evidenciando-se a interferência desses reagentes na análise espectrométrica. Por meio de extrações aquosas e alcalinas detectou-se concentração igual ou superior a 50% de açúcares totais, por espectrometria. Desses no extrato aquoso prevaleceram os monossacarídeos arabinose e xilose, sendo encontrados na provável estrutura de arabinoxilana, polissacarídeo já relatado no gênero *Persea*. Nos extratos alcalinos foram detectados em geral xilose, arabinose e glucose, provavelmente presentes como xilana, arabinoxilana e arabinoglucana no material vegetal; analisados por Cromatografia Gasosa. Ácidos Urônicos foram detectados por espectrometria, em maior quantidade na fração aquosa. Todas as amostras analisadas foram consideradas heterogêneas, por meio da análise de Cromatografia de Exclusão Molecular de Alta Resolução. Na determinação de proteínas totais os percentuais obtidos foram baixos para todas as frações extrativas. Foram produzidas formulações em pomada, creme e gel, as quais devem ser melhoradas para obtenção de melhor homogeneidade e maior estabilidade de pH. Na avaliação preliminar apenas a embalagem de alumínio foi considerada satisfatória, podendo ser um possível sistema de embalagem para as formulações desenvolvidas.

Palavras-chave: Lauraceae. *Persea major*. Cicatrização. Polissacarídeos. Fenólicos. Formulações para uso tópico.

ABSTRACT

Lauraceae family is composed by 52 genus and about 3000 species, the great majority of these, wood. The trunk's barks of *Persea major* (Meisn.) L.E.Kopp are common used in lesions, cutaneous inflammations and gastric disorders, presenting mucilaginous nature and healing action. There are few studies to identify chemical and cutaneous application of the specie, popularly known as pau-andrade and abacate-bravo, among others. This research was focused on the identification of glicidic and phenolic composition of specie's barks; involved in wound healing; along with development and preliminary evaluation of different formulations for topical use with incorporation of lyophilized extract. Were detected, in the dry and stabilized trunk's barks, aminogroups, steroids/triterpenoids, tannins, saponins and total sugars. By means of aqueous and alkaline extractions was detected equal concentration or greater than 50% of total sugars, by spectrometry. These on aqueous extract prevailed the monosaccharides arabinose and xylose, being found on probable structure of arabinoxylan, polysaccharide has been reported on genus *Persea*. On alkaline extracts was detected in general xylose, arabinose and glucose, probable presents as xylan, arabinoxylan and arabinoglucan on plant material; analyzed by Gas Chromatography. Uronic acids were detected by spectrometry in greater quantity in the aqueous fraction. All samples analized were considered heterogeneous, profile High Pressure Size Molecular Chromatography. In the determination of total proteins; the percentages obtained were low for all fractions extractive. Regarding the phenolic composition, the result obtained was 1,27 g%. In determining of total tannins there was obtained 3,41 g% concentration, using the reagent Folin-Denis, and 0,66 g% with the reactive Folin-Ciocalteu; both expressed in equivalents of pyrogallol; evidencing the interference of theses reagents on spectrometry assay. Formulations were produced in an ointment, cream and gel, which must be improved to ensure more stability during storage. In the preliminary assessment only the aluminum was satisfactory and could be a possible packaging system for the formulations developed.

Key-words: Lauraceae. *Persea major*. Wound healing. Polysaccharides. Phenolics. Formulations for topical use.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ÁRVORE DE <i>Persea major</i> (MEISN.) L.E.KOPP	23
FIGURA 2 -	DETALHES DA CASCA DE <i>Persea major</i> (MEISN.) L.E.KOPP	24
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DA PELE, EPIDERME, DERMIS E HIPODERME.....	26
FIGURA 4 -	(A) ESTRUTURA DO TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO; (B) EXEMPLO DE TANINO CONDENSADO (PROANTOCIANIDINA)	30
FIGURA 5 -	(A) MONOSSACARÍDEOS DO TIPO ALDOPENTOSE; (B) MONOSSACARÍDEO DO TIPO ALDOHEXOSE	32
FIGURA 6 -	ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	46
FIGURA 7 -	ESQUEMA PARA A PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO.....	54
FIGURA 8 -	CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	56
FIGURA 9 -	CURVA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS	60
FIGURA 10 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA PMAQ EM ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE, POR HPSEC	63
FIGURA 11 -	CURVA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	64
FIGURA 12 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C	67
FIGURA 13 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C	68
FIGURA 14 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C	71
FIGURA 15 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C	71
FIGURA 16 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C... ..	74
FIGURA 17 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C... ..	74
FIGURA 18 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C	76
FIGURA 19 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C	77
FIGURA 20 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C	79
FIGURA 21 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C	79
FIGURA 22 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C	81
FIGURA 23 -	GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Persea major</i> (MEISN.) L.E.KOPP	23
QUADRO 2 - REAÇÃO DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENÓIDES	41
QUADRO 3 - CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE	50
QUADRO 4 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CASCAS DE <i>Persea major</i> (MEISN.) L.E.KOPP.....	55
QUADRO 5 - CARACTERES FÍSICOS POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C	67
QUADRO 6 - CARACTERES FÍSICOS POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C	70
QUADRO 7 - CARACTERES FÍSICOS GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C	73
QUADRO 8 - CARACTERES FÍSICOS GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C	76
QUADRO 9 - CARACTERES FÍSICOS CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C	78
QUADRO 10 - CARACTERES FÍSICOS CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRATIVAS.....	59
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS	60
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS	61
TABELA 4 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	64

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVO GERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.2 FAMÍLIA LAURACEAE	21
2.3 GÊNERO <i>PERSEA</i> MILLER.....	22
2.4 ESPÉCIE <i>PERSEA MAJOR</i> (MEISN.) L.E.KOPP	22
2.5 CICATRIZAÇÃO	25
2.5.1 PRODUTOS E PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NA CICATRIZAÇÃO	27
2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	29
2.6.1 TANINOS.....	30
2.7 POLISSACARÍDEOS.....	31
2.8 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO EXTERNO.....	34
2.8.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	35
3 METODOLOGIA	37
3.1 PERFIL FITOQUÍMICO.....	37
3.1.1 PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E AQUOSO A 20%.....	37
3.1.2 DETERMINAÇÕES DE CARACTERES FÍSICOS E PH DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	37
3.1.3 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE SÓLIDOS (%).....	38
3.1.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS	38
3.1.5 PESQUISAS DE METABÓLITOS BIOATIVOS.....	39
3.1.5.1 Alcalóides:	39
3.1.5.2 Aminogrupos:	40
3.1.5.3 Esteróides e/ou triterpenóides:	41
3.1.5.4 Taninos:.....	41
3.1.5.5 Saponinas:	43
3.1.5.6 Geninas e açúcares totais	43
3.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	44
3.2.1 DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS	45
3.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	45
3.3.1 EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO-METANOL.....	46
3.3.2 EXTRAÇÃO COM METANOL-ÁGUA.....	47
3.3.3 EXTRAÇÃO AQUOSA.....	47

3.3.4 EXTRAÇÃO ALCALINA COM KOH 2%	48
3.3.5 EXTRAÇÃO ALCALINA COM KOH 10%	48
3.4 AÇÚCARES TOTAIS	49
3.5 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	50
3.6 DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS	51
3.7 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE	52
3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	52
3.9 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1 PERFIL FITOQUÍMICO.....	55
4.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	56
4.2.1 DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS	57
4.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	59
4.4 AÇÚCARES TOTAIS	60
4.5 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS	61
4.6 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE	62
4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	63
4.8 FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO	65
4.8.1 POMADA	65
4.8.1.1 Embalagem Plástica de Polipropileno	66
4.8.1.2 Embalagem de Alumínio	70
4.8.2 GEL HIDROFÍLICO.....	72
4.8.2.1 Embalagem Plástica de Polipropileno	72
4.8.2.2 Embalagem de Alumínio	75
4.8.3 CREME.....	77
4.8.3.1 Embalagem Plástica de Polipropileno	78
4.8.3.2 Embalagem de Alumínio	80
5 CONCLUSÕES	83
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como forma de tratamento para desordens é relatado desde as antigas civilizações até os dias atuais. O acúmulo do conhecimento sobre as propriedades terapêuticas naturais vem sendo passado ao longo das gerações, principalmente por meio do conhecimento popular, o qual se tornou a base para a pesquisa em produtos naturais (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; BRASIL, 2006).

Relacionado ao uso de plantas terapêuticas encontra-se a fitoterapia, ciência caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas; a qual apresenta adesão pela maioria da população mundial. Vários estudos relatam a importância da divulgação dessa terapêutica com relação à saúde pública; destacando a importância dos países em desenvolvimento, ricos em biodiversidade (BRASIL, 2006; MOSSI *et al.*, 2009).

No contexto do uso de plantas medicinais cita-se a espécie *Persea major* (Meisn.) L.E.Kopp, com utilização da casca pelos populares em lesões, inflamações cutâneas e distúrbios gástricos. A espécie apresenta caráter mucilaginoso, sendo observada ação cicatrizante (MARANHO, 1998; BATISTA *et al.*, 2010).

Com relação ao processo de cicatrização cutânea, substâncias como os polissacarídeos e os taninos podem estar relacionados a esse efeito. Em alguns vegetais superiores o uso da mucilagem; material rico em sacarídeos; está relacionado com a ação protetora das mucosas inflamadas. Tal proteção impede a ação de substâncias irritantes e diminui estados inflamatórios, aliviando a dor.

Mecanismo semelhante de proteção é relatado para os taninos, estes formam complexos com as proteínas cutâneas, diminuindo a permeabilidade da pele. São utilizados em processos de ferida, queimaduras, inflamação. Também apresentam atividades fungicida, bacteriostática e antiviral (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010).

Como são poucos os estudos relacionados com a identificação dos constituintes químicos de *P. major*, e suas formas de administração; justifica-se este trabalho como uma ferramenta na caracterização da espécie e no desenvolvimento e avaliação preliminar de formulações farmacêuticas tópicas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química de cascas de *Persea major* (Meisn.) L.E.Kopp; desenvolver e realizar avaliação preliminar de diferentes formulações tópicas; adequadas ao uso popular cicatrizante. Com isto estima-se contribuir na caracterização da espécie, aumentando os conhecimentos sobre a família Lauraceae e o gênero *Persea*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a composição química da espécie;
- Obter extratos hidroalcoólicos, aquosos e frações orgânicas a partir de cascas secas e estabilizadas de *P. major*;
- Dosear compostos polifenólicos, em especial os taninos;
- Extrair a composição polissacarídica da espécie;
- Avaliar o rendimento das frações extrativas para polissacarídeos;
- Identificar a composição de monossacarídeos, ácidos urônicos e proteínas, a partir das amostras oriundas da extração polissacarídica;
- Avaliar a homogeneidade das amostras polissacarídicas;
- Preparar extratos aquosos por exaustão do material vegetal, com posterior congelamento e liofilização;
- Desenvolver diferentes formulações tópicas contendo o extrato aquoso liofilizado – pomada, creme e gel;
- Avaliar de maneira preliminar as formulações desenvolvidas, em diferentes condições de embalagem;
- Analisar os caracteres físicos e o pH das formulações produzidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O início do emprego das plantas para tratamento de doenças ocorreu de forma empírica, sendo selecionadas por experimentos as espécies de maior interesse. Tal conhecimento foi transmitido ao longo de gerações por meio de comunicação verbal e descrições em livros deixados por antigas civilizações. Observou-se um grande interesse pelo estudo das plantas medicinais, com aumento nas pesquisas, publicações de grande qualidade e rigor científico, e organização de congressos e simpósios; fatores que foram observados pelo aumento da informação técnica disponível (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Relacionado ao uso de plantas medicinais cita-se a fitoterapia, terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal, denominados medicamentos fitoterápicos. O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia, com uma biodiversidade vegetal ampla no uso de plantas medicinais, vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente esse conhecimento (BRASIL, 2006).

A Portaria nº 971 de 2006 definiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS; a qual preconizou a readequação dos planos, programas, projetos e atividades nos órgãos de saúde, baseados na inclusão de novos tipos de tratamentos, como a fitoterapia. Dessa maneira objetivou-se a prevenção de agravos e promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde (BRASIL, 2006).

Fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Assim como todos os medicamentos, os fitoterápicos devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou

publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (ANVISA, 2007a).

Observa-se um aumento no interesse pela fitoterapia devido a diversos fatores, tais como: aumento de informação sobre constituintes ativos e farmacologia de fármacos vegetais, surgimento de novas formas farmacêuticas com medicamentos à base de plantas e desenvolvimento de métodos analíticos que garantem um melhor controle de qualidade da matéria-prima e produto acabado. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. Todos esses fatores resultam na produção de medicamentos à base de plantas com qualidade, eficácia e segurança (ANVISA, 2007a; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

O uso de plantas com propriedades farmacêuticas tem aumentado, tanto com relação ao uso homeopático quanto ao alopático, sendo demonstrado um importante papel das plantas medicinais na saúde pública (MOSSI *et al.*, 2009).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza plantas medicinais ou preparações desta, no que se refere à atenção primária de saúde.

Dentre as famílias botânicas utilizadas popularmente por suas propriedades terapêuticas, relata-se a família Lauraceae.

2.2 FAMILIA LAURACEAE

Segundo Batista e colaboradores (2010), a família Lauraceae é composta de 52 gêneros e cerca de 3000 espécies, muitas vindas das regiões tropicais e subtropicais quentes. Dentre as espécies incluídas nessa família, a grande maioria é lenhosa e são encontradas nas florestas centro e sul-americanas. Além disso, a família Lauraceae possui ainda importância fitossociológica, o que se justifica por sua ampla distribuição e representatividade. No estado do Paraná, em específico nos remanescentes de Floresta Atlântica, as espécies pertencentes à citada família são as que apresentam maior riqueza florística (MARANHO; PREUSSLER; ROCHA, 2009).

A família Lauraceae constitui um dos grupos taxonômicos de maior dificuldade para a caracterização das espécies, na qual diferentes gêneros apresentam semelhante morfologia. A princípio era dada importante atenção aos caracteres florais, porém outros autores sugerem que a definição taxonômica seja baseada na combinação de caracteres anatômicos da casca, lenho e tipo de inflorescência (OLIVEIRA; CALADO; MARQUETE, 2001).

A maioria das espécies da família Lauraceae possui importância econômica por sua madeira, óleos essenciais e frutos comestíveis, neste último destacando-se a espécie *Persea americana*, que possui como fruto o abacate (MARANHO, 1998).

2.3 GÊNERO *Persea* MILLER

Persea é um gênero pertencente à família Lauraceae, que compreende cerca de 200 espécies, sendo a espécie *Persea americana* a mais estudada e o abacate o membro mais conhecido desse gênero (BATISTA *et al.*, 2010). Ainda sobre o abacate, segundo Maranho (1998), é o produto mais comercializado entre as Lauraceae e sua polpa é também utilizada como base na preparação de cosméticos.

2.4 ESPÉCIE *Persea major* (Meisn.) L.E.Kopp

A espécie *P. major* possui como sinônimas comuns as seguintes citações: abacate-do-mato, abacate-bravo, canela-rosa, massaranduba e pau Andrade. Além desses, possui os seguintes sinônimos científicos: *Persea pyrifolia* var. B Nees; *P. pyrifolia* var. B *major* Meissner; *P. cordata* var. *major* (Meissner) Mez; *P. cordata* var. *pubescens* Glaz. e *P. tranninensis* Glaz. nom. nun. (Ibid.) (MARANHO, 1998; QUINET *et al.*, 2011).

Para *P. major* a maioria dos estudos refere-se à utilização de sua madeira na construção civil, marcenaria, construção de móveis e até canoas em tronco inteiro. A espécie (Figura 1) pode chegar até 12 metros de altura, ocorrendo seu florescimento de novembro a janeiro e sua frutificação de fevereiro a março (MARANHO, 1998).



FIGURA 1 - ÁRVORE DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP.
FONTE: SILVA (2010)

Seu enquadramento taxonômico (Quadro 1) apresenta-se segundo os diferentes sistemas de classificação:

	CRONQUIST (1981)	Engler (1924) <i>apud</i> LAWRENCE (1951)	APGIII
Divisão	Magnoliophyta	Spermatophyta	-
Classe	Magnoliopsida	Angiospermae	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae	Dicotyledoneae	Magnoliidae Novák ex Takht
Ordem	Laurales	Ranales	Laurales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Subordem	-	Magnoliineae	Magnolianaes Takht.
Família	Lauraceae A.L. Jussieu		
Gênero	<i>Persea</i> Miller		
Espécie	<i>Persea major</i> (Meisn.) L.E.Kopp		

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP
FONTE: MARANHO (1998); QUINET *et al.* (2011).

P. major é uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais (MARANHO, PREUSSLER E ROCHA, 2009). No Brasil sua distribuição abrange o nordeste, sudeste e sul, com domínios no serrado e mata atlântica (QUINET *et al.*, 2011).

Poucos estudos até o momento foram realizados no sentido de identificação e isolamento dos componentes químicos da espécie.

MA e colaboradores (1989) relataram a presença de dois compostos ativos isolados a partir do extrato etanólico de cascas de *P. major*, tratando-se de um par

de alceno-alcino- δ -lactona, ambas as estruturas são moderadamente citotóxicas, sendo uma considerada um pesticida seletivo.

Segundo Maranhão (1998), foram observados diversos grupos de metabólitos, sendo os de maior concentração ácidos graxos, aminogrupos, esteróides e/ou triterpenos e taninos condensados. O que se observa é a relação dos metabólitos detectados e o possível envolvimento na ação cicatrizante observada popularmente.

Em ensaios preliminares constatou-se que a espécie apresenta inibição frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, pelo método qualitativo de difusão em disco, e não apresenta atividade inibitória para a espécie fúngica *Candida sp* (MELLO, 2003).

Cosmo e colaboradores (2007) relataram a atividade citoprotetora do extrato hidroalcoólico bruto de *P. major* contra lesões gástricas induzidas por etanol.

Estudo realizado com três espécies pertencentes à família Lauraceae, relataram a presença de quatro diferentes estruturas de furano-lignan na espécie *P. pyrifolia* (BATISTA *et al.*, 2010).

A casca (Figura 2) é de grande importância na identificação de árvores, e seu estudo desperta o interesse em contribuir para a distinção entre espécies de mesma família; ainda mais com a escassez de estudos relacionados com o reconhecimento do gênero *Persea* (MARANHÃO; PREUSSLER; ROCHA, 2009).



FIGURA 2 - DETALHES DA CASCA DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP
FONTE: SILVA (2010)

A casca apresenta alto caráter mucilaginoso quando em contato com a água. Quando em presença de água as mucilagens incham e tomam um aspecto particular de soluções coloidais ou géis. O uso da mucilagem está relacionado, entre outros efeitos terapêuticos, por sua ação protetora das mucosas inflamadas, impedimento

da ação de substâncias irritantes e diminuição dos estados inflamatórios, aliviando a dor (COSTA, 2002).

As mucilagens são definidas como substâncias macromoleculares de natureza glicídica heterogênea, ricas em polissacarídeos, compostos por pentoses, hexoses e ácidos urônicos.

As mucilagens e gomas são substâncias que podem gerar conflito quanto às suas definições. Dentre os fatores de diferenciação está a forma de obtenção e caracteres físicos; as gomas são exsudatos definidos como produtos de origem patológica, enquanto as mucilagens são constituintes normais vegetais; as gomas apresentam alta solubilidade em água, enquanto as mucilagens entumescem, apresentando-se como massas viscosas. Plantas como alteia (*Althaea officinalis* L.), linho (*Linum usitatissimum* L.), malva (*Malva silvestris* L.) e tanchagem (*Plantago major* L.) são vegetais ricos em mucilagem (CUNHA, 2010).

O uso popular de *P. major*, refere-se à atividade cicatrizante.

2.5 CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização ocorre sempre que há lesão nos tecidos por diversos fatores, como cortes, agentes químicos, traumatismo, calor e outros fenômenos. Este processo tem por objetivo a reconstituição do tecido lesionado, envolvendo diversas células e mediadores químicos, dependendo do tipo da ferida apresentada (GUYTON, 2008).

Focando em feridas cutâneas, para o melhor entendimento da cicatrização se faz necessária a descrição da estrutura e fisiologia da pele. A pele é o maior órgão do corpo, e está ligada a funções de cobertura, proteção, regulação térmica, percepção sensorial, síntese de melanina, entre outros (HESS, 2002).

Entre as camadas da pele (Figura 3), a epiderme é a camada mais externa, sendo constituída principalmente por células epiteliais e queratina. A derme é composta por tecidos conjuntivos fibrosos de colágeno e elastina, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, vasos sanguíneos, terminações nervosas e uma rede de linfáticos. Além disso, a hipoderme ou tecido subcutâneo é o tecido de

suporte para a epiderme e derme, rico em células adiposas (HESS, 2002; PRISTA *et al.*, 2008).

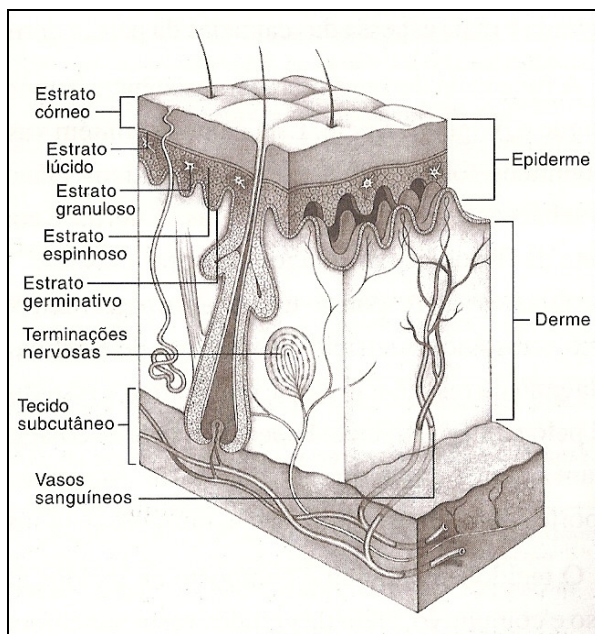


FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PELE, EPIDERMIS, DERMIS E HIPODERMIS
FONTE: DEALEY (2001, p. 8)

As lesões que atingem a epiderme e a camada superficial da derme são ditas feridas de espessura parcial. Estas são inicialmente cobertas por uma crosta; células epiteliais separam-se da membrana basal (camada mais interna da epiderme), migram em direção à lesão e proliferam-se por mitose. A regeneração nesse caso é chamada de reepitelização, e o processo cicatrizante ocorre sem deixar nenhum tecido cicatricial, fechando totalmente a ferida. Esse processo tem duração mais curta do que no caso de lesões dérmicas, levando de 24 a 48 horas para a resposta celular (GOGIA, 2003).

Lesões que afetam toda a epiderme, derme e tecidos subcutâneos são chamadas de lesões dérmicas. A cicatrização nesses casos é altamente complexa, envolvendo fases de inflamação, proliferação de fibroblastos, e remodelamento ou maturação do tecido lesionado (DEALEY, 2001; HESS, 2002; GOGIA, 2003).

A fase inflamatória dura de 24 a 48 horas para o início e até duas semanas para a finalização. O processo inflamatório desencadeia a cicatrização, sendo essencial para a regeneração celular do local traumatizado. Nessa fase ocorrerão fenômenos biológicos de vasoconstrição, liberação de mediadores químicos e

células de defesa, vasodilatação, formação de coágulo, fagocitose e neovascularização. O sangramento é estancado e o local da ferida é limpo, para reparação tecidual (DEALEY, 2001; HESS, 2002; GOGIA, 2003; GUYTON, 2008).

Na fase fibroblástica ou proliferativa, acontece a epitelização, síntese de colágeno e contração da ferida. Nessa fase é observado o tecido de granulação, com aspecto vermelho, brilhante, granuloso. Esse tecido é composto por macrófagos, fibroblastos, colágeno imaturo, vasos sanguíneos e substância matricial. Na epitelização as células migram da borda da ferida, reduzindo a superfície da lesão (HESS, 2002).

Para a contração da lesão geralmente se tem o início cinco dias após a injúria, ocorrendo o ápice em duas semanas. Feridas não fechadas em torno de três semanas tem o encerramento da retração para fechamento por formação de cicatriz. O tamanho da lesão não afeta a taxa de contração, entretanto o formato da ferida é determinante; feridas lineares contraem rapidamente, feridas quadradas e retangulares moderadamente, e feridas circulares contraem lentamente. Além disso, o local da lesão também será importante na retração, sendo o processo otimizado para locais menos expostos as condições externas e de movimentos (GOGIA, 2003).

A fase de remodelamento ou maturação ocorre em torno de duas a quatro semanas, dependendo do local e tamanho da ferida. Nela ocorrem mudanças na forma, tamanho e resistência da cicatriz, diretamente relacionadas ao equilíbrio de síntese, lise e orientação das fibras de colágeno. Esse processo é mantido até que o tecido cicatricial tenha recuperado 80% da força original da pele (DEALEY, 2001; HESS, 2002; GOGIA, 2003).

Fatores como a nutrição, vascularização, medicamentos sistêmicos e tópicos, idade, infecção local e tipo de curativo também são interferentes no processo de cicatrização (GOGIA, 2003).

2.5.1 Produtos e plantas medicinais utilizadas na cicatrização

O Brasil conhecido internacionalmente como possuidor da maior reserva florestal diversificada do planeta. O potencial dessa flora para uso na medicina tem sido destacado no meio científico, interessado em descobrir novas substâncias que

possam atuar no processo cicatrizante das mais diversas origens, como na reparação cirúrgica (MALAFAIA, 2006).

O uso de fitoterápicos como aceleradores da cicatrização vem sendo utilizado há muito tempo (VALE *et al.*, 2006).

Diversas espécies de diferentes famílias foram utilizadas com este objetivo, apresentando composições químicas diferentes e, portanto, um ou mais grupos químicos que são responsáveis pelo efeito cicatrizante. Espécies como *Galinsoga parviflora* (picão-branco), *Petiveria alliacea* (guiné), *Schinus molle* (aroeira), *Waltheria douradinha* (douradinha), *Xanthium cavanillesii* (carrapicho), *Passiflora edulis* (maracujá), *Jatropha gossypifolia* L (pião roxo), *Orbignya phalerata* (babaçu), entre outras são utilizadas como cicatrizantes pela população brasileira (MALAFAIA *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2009).

Na maioria das vezes o uso de plantas medicinais é meramente baseado no conhecimento popular, sem qualquer evidência científica da eficácia, segurança, e relação dos componentes químicos responsáveis pelo efeito; ressaltando a importância do estudo químico e aplicação tecnológica dessas diferentes espécies (SCHMIDT *et al.*, 2009).

Para um tratamento eficaz na cicatrização de lesões, diversos produtos foram utilizados no intuito de proporcionar um ambiente apropriado para o processo cicatrizante. Dentre as substâncias destacaram-se os antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e anestésicos, e produtos para limpeza; como antissépticos, soro fisiológico e água (DEALEY, 2001; GOGIA, 2003).

O desempenho de qualquer produto cicatrizante está diretamente relacionado à sua capacidade de promover condições para uma rápida e eficaz cicatrização. Para tanto, o produto deverá manter um ambiente úmido sobre a lesão, possuir propriedades antibacterianas e possuir propriedades de absorção de fluidos (DEALEY, 2001).

Acredita-se que um ambiente úmido facilita a migração das células epiteliais, diminui a dor e favorece os processos autolíticos. Muitas formulações cicatrizantes previnem a contaminação bacteriana por possuírem em suas composições agentes antimicrobianos; ou por criarem uma espécie de barreira entre a lesão e o ambiente externo. Além disso; não se tem a relação correta da umidade necessária para a cicatrização da ferida, e a quantidade excedente capaz de macerar o local lesionado, ou ainda proporcionar condições ideais para uma possível infecção

microbiana. São qualidades desejáveis para produtos eficazes no tratamento de feridas: facilidade de aplicação, adaptabilidade, facilidade de remoção, conforto, e não haver necessidade de frequentes trocas ou reaplicações (DEALEY, 2001).

Visto o potencial da atividade cicatrizante dos polissacarídeos e taninos, e a sua presença nas cascas de *P. major*, pode-se relatar outros bioativos de interesse.

2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos ou polifenóis são substâncias que possuem o núcleo fenol em sua estrutura química, isto é, possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. São substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade. Substâncias oxidantes são empregadas para a caracterização dos polifenóis em geral, sendo evidenciada a presença pelo desenvolvimento de colorações específicas, conforme o método adotado. Metabólitos secundários como flavonóides, taninos e antraquinonas pertencem ao grupo dos polifenóis, sendo caracterizados por reações particulares de cada grupo (SIMÕES *et al.*, 2010).

De acordo com a definição genérica de polifenóis, há vários grupos químicos de classificação diferenciada, como alcalóides e terpenos, que seriam inclusos em tal definição. Hoje se aceita que os compostos fenólicos são todos que contêm um ou mais anéis aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo do ácido xiquímico e/ou da via do acetato. Entre os compostos fenólicos, os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e quinonas destacam-se por suas atividades farmacológicas (CUNHA, 2010).

Os compostos fenólicos compõem uma parte das estruturas das paredes celulares das plantas, principalmente em conjunto com a lignina e suberina, atuando no suporte mecânico e como barreira contra invasões microbianas. No vegetal, possuem diversas funções, como defesa contra predadores, caracterizadores de odor, da pigmentação e do sabor dos vegetais. Na medicina são utilizados na alimentação, nos vinhos e chás, devido ao sabor adstringente (MALINOWSKI, 2010).

2.6.1 Taninos

São compostos fenólicos hidrossolúveis, com massa molar aproximadamente entre 500 e 3000 Dalton, os quais formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas, precipitando-os. São conhecidos por curtir as peles, tornando-as pouco permeáveis, sendo utilizados na produção do couro. De acordo com essa propriedade, são também utilizados em processos de ferida, queimaduras e inflamações, por formar uma camada protetora sobre o tecido (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010).

São caracterizados em dois grupos, os taninos condensados e os hidrolisáveis. O primeiro grupo forma-se a partir da condensação de unidades de flavonoides (Figura 4b); o segundo a partir da união de moléculas de ácido gálico (Figura 4a) e uma molécula de açúcar (SIMÕES *et al.*, 2010).

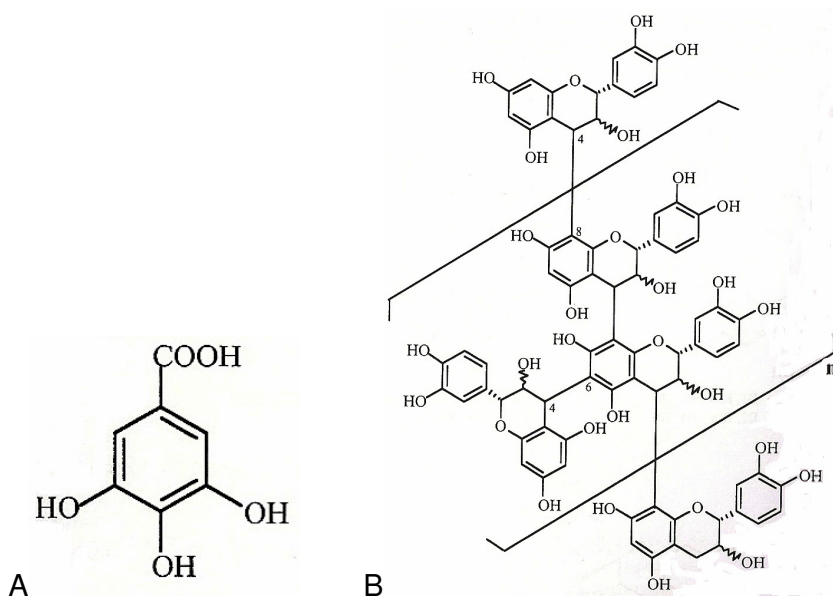


FIGURA 4 - (A) ESTRUTURA DO TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO; (B) EXEMPLO DE TANINO CONDENSADO (PROANTOCIANIDINA)
 FONTE: CUNHA (2010, p. 293 - A, p. 302 - B).

Os taninos apresentam atividades fungicida, bacteriostática e antiviral, por meio de inibição enzimática, sendo utilizados em casos de úlcera gástrica; além disso, possuem atividade antioxidante, sendo aplicados em casos de doenças degenerativas (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010).

A adstringência característica dos taninos e a formação de complexos com as fibras de colágenos da pele podem ser explicadas por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre esses e macromoléculas. A estabilidade desses complexos está diretamente relacionada ao tamanho molecular dos taninos e ao número de ligações formadas (CUNHA, 2010).

A distribuição dos taninos no vegetal é ampla e são estruturas de caráter altamente heterogêneo. Podem ocorrer na mesma planta sob as formas hidrolisável e condensada, sendo encontrados geralmente em folhas, frutos, cascas e madeiras. Carvalho (*Quercus* sp.), hamamelis (*Hamamelis virginiana* L.) e ratânia (*Krameria triandra* Ruiz e Pa.) são exemplos de vegetais com taninos na composição química. São empregados na indústria têxtil e de corantes, na indústria alimentar para clarificar vinhos, cerveja e também como antioxidantes (CUNHA, 2010).

Biologicamente os taninos têm sido investigados na relação da defesa química das plantas contra organismos invasores, predadores ou patogênicos. Os taninos podem estar envolvidos na inibição da alimentação de herbívoros, por mecanismos de diminuição da palatabilidade, devido ao sabor adstringente do grupo; dificuldades na digestão por causa do complexo tanino-proteína e por formação de produtos tóxicos, recorrente à hidrólise dos taninos no processo digestivo (SIMÕES *et al.*, 2010).

2.7 POLISSACARÍDEOS

Muitas atividades farmacológicas têm sido observadas para os polissacarídeos presentes em plantas medicinais, como atividade imunoestimulante, antiúlcera, antimetástase e antinefrite, além de atividade hipoglicemiante e efeitos na diminuição do colesterol (LUIJENDIJK, 2000).

Depois da água, os polissacarídeos são os principais constituintes químicos presentes na maioria dos tecidos e células das plantas; sendo a grande maioria desses compostos encontrados na parede celular das plantas. Esses açúcares são também classificados em dois grandes grupos, os de reserva e os estruturais; destacando-se o amido, a sacarose e as frutanas, como os carboidratos de reserva

mais abundantes e metabolizáveis em plantas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997; DEY e HARBORNE, 1997).

Os polissacarídeos encontram-se no grupo dos carboidratos, estando dentre os três principais tipos desse grupo, juntamente com os oligossacarídeos e os monossacarídeos; constituindo as unidades químicas fundamentais dos carboidratos mais complexos. Quimicamente os polissacarídeos são polímeros de condensação, de elevada massa molar e que contêm dez ou mais unidades monossacarídicas ou seus derivados (ácidos urônicos, compostos aminados, etc.) (SIMÕES *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos da parede celular de plantas são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose, relacionados à estrutura e forma de extração; além desses, proteínas e compostos fenólicos como ligninas também fazem parte da composição vegetal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997; CIPRIANI, 2003).

As pectinas são polissacarídeos complexos, altamente ramificados e hidrófilos, ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. As hemiceluloses são polímeros de celulose, em que a maior parte dos resíduos de glucose (Figura 5b) apresenta ramificações com outros hidratos de carbono, principalmente xilose (Figura 5a). São exemplos: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, glucoromananas, xiloglucanas, calose, β -glucanas e arabinogalactanas. A celulose é um polímero de glucose, com arranjo molecular que lhe confere insolubilidade e grande resistência às forças de tração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997; CIPRIANI, 2003).

Alguns dos monossacarídeos citados são apresentados estruturalmente na figura 5.

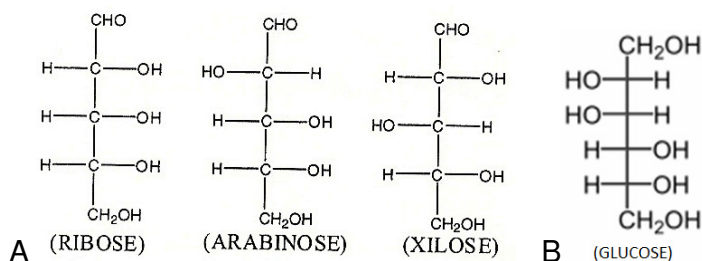


FIGURA 5 - (A) MONOSSACARÍDEOS DO TIPO ALDOPENTOSE; (B) MONOSSACARÍDEO DO TIPO ALDOHEXOSE

FONTE: (A) CUNHA (2010, p. 132); (B) O autor (2011)

As pectinas são extraídas com soluções aquosas contendo substâncias quelantes; as hemiceluloses são mais difíceis de remover do material da parede celular, sendo utilizadas soluções bastante concentradas de hidróxido de sódio ou

potássio. O resíduo após a extração das pectinas e hemiceluloses apresenta grande concentração de celulose (CIPRIANI, 2003).

Os polissacarídeos podem ser extraídos; além de plantas (incluindo as algas); de animais, fungos ou são obtidos via fermentação microbiológica. Estes possuem uma ampla gama de aplicações industriais; especialmente nas áreas de alimentos, biomédica, farmacêutica e de cosméticos. Na indústria alimentícia, eles são amplamente empregados como estabilizantes e espessantes. Os polissacarídeos de algas são empregados como agentes geleificantes. Gomas de sementes e de exsudatos, além de carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose, são utilizadas como retentores de umidade. Na área biológica eles são aplicados em engenharia de tecidos, imobilização de enzimas, biossensores, como veículo de liberação de fármacos, entre outros (CUNHA *et al.*, 2009).

Polissacarídeos isolados de produtos naturais (cogumelos, algas, líquens e vegetais superiores) têm chamado a atenção da área biomédica, devido ao amplo espectro de propriedades terapêuticas e à baixa toxicidade. Estudos relatam que existem mais de 300 tipos de polissacarídeos isolados de produtos naturais (MORETONI, 2008).

Polissacarídeos também são focos de pesquisa nos problemas da pele, aumentando a proliferação e estimulação dérmica por estímulo na produção de queratinócitos, auxiliando a cicatrização (DETERS *et al.*, 2001). Atividades biológicas, tais como antivirais, antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes e antitrombóticas também estão sendo investigadas para polissacarídeos extraídos de diversas fontes (CUNHA *et al.*, 2009).

Estudos reportam a extração e identificação de polissacarídeos de cascas de *Persea americana*; no qual foram apresentadas duas arabinoxilanas, obtidas cada uma por extrações aquosas e alcalinas, separadamente. A estrutura isolada por extração aquosa mostrou massa molar de 600,000 Da, aproximadamente, sendo composta por l-arabinose e d-xilose, na razão molar de 3:1. A arabinoxilana obtida por extração alcalina demonstrou massa molar de 1.300,000 Da, aproximadamente, e composição de 95 % de d-xilose e 5 % de l-arabinose (GOWDA *et al.*, 1988).

2.8 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO EXTERNO

A administração de formulações para uso externo ou aplicação local é amplamente utilizada para afecções e alterações da pele e seus anexos. Diferentes formas farmacêuticas são produzidas para este fim, como géis, pomadas, emulsões, soluções, entre outros, destacando-se nesse quadro as formulações semi-sólidas (ANSEL *et al.*, 2000).

Entende-se por medicamentos tópicos os que se aplicam, externamente, sobre uma região limitada do corpo, não proporcionando absorção sistêmica dos seus constituintes (PRISTA *et al.*, 2008). Em geral, os fármacos aplicados à pele para ação local são antissépticos, antifúngicos, antiinflamatórios, anestésicos locais, emolientes e protetores contra determinadas condições ambientais (COSTA, 2010).

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica requer o conhecimento das características físicas, químicas e biológicas de todas as substâncias ativas e excipientes utilizados na preparação (NUNES, 2008). São realizados estudos de pré-formulação, avaliando as características físicas, químicas e físico-químicas do fármaco e sua compatibilidade com os excipientes a serem utilizados. Com estes conceitos, são desenvolvidas formulações em nível laboratorial que possibilitem a estabilização do fármaco, seguidas de avaliação preliminar dos aspectos físicos e físico-químicos da forma farmacêutica.

O estudo de estabilidade é um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos. Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram também fornecer informações para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; embalagens alternativas e a confirmação do prazo de validade estimado (COSTA, 2010).

2.8.1 Estudos de estabilidade

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, visando definir seu prazo de validade, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (ANVISA, 2004; BRASIL, 2005).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (fatores extrínsecos) e de outros relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição (fatores intrínsecos) (BRASIL, 2005).

Focando no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, o estudo de estabilidade preliminar (acelerado) é composto por testes iniciais, tais como: caracteres organolépticos, pH, separação de fases em emulsões e cremes e perda de peso. Além disso, de acordo com a fase de desenvolvimento da formulação análises como teor do princípio ativo, quantificação de produtos de degradação e limites microbianos também são parâmetros interessantes na avaliação do desenvolvimento do produto (BRASIL, 2005).

Para o teste de estabilidade acelerado as amostras são colocadas em condições extremas de temperatura e umidade ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$), para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Além disso, o estudo de estabilidade de longa duração; também conhecido como teste de prateleira; tem como condições gerais temperaturas menos estressantes ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$) e período de duração igual ou superior ao prazo de validade proposto. Possui como objetivo a verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005).

Os dados obtidos de um estudo de estabilidade acelerado juntamente aos dados preliminares obtidos do estudo de longa duração podem ser utilizados para avaliação do impacto que os efeitos físicos e químicos promovem em um produto

farmacêutico, principalmente quando este é exposto a condições fora das estabelecidas pela rotulagem. São testes obrigatórios para o registro e pós-registro de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005).

3 METODOLOGIA

3.1 PERFIL FITOQUÍMICO

As cascas secas e estabilizadas foram fragmentadas e moídas em condição ambiente. As cascas moídas foram acondicionadas em potes plásticos com capacidade de 5 Kg, hermeticamente fechados.

Os ensaios fitoquímicos foram realizados segundo metodologia utilizada no laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR, para confirmação dos grupamentos químicos presentes na espécie, de acordo com MOREIRA (1979), modificado por NAKASHIMA (1993).

3.1.1 Preparo dos extratos hidroalcoólico e aquoso a 20%

Pesou-se 40 g do vegetal e adicionou-se 200 mL de água destilada ou etanol a 70% (v/v em água), deixando macerar em banho-maria a temperatura moderada (60 °C) durante 2 h, aproximadamente. Após, foram filtrados e armazenados em frascos âmbar para as análises. Nos extratos hidroalcoólico e aquoso foram pesquisados: alcalóides, esteroides e /ou triterpenóides, aminogrupos, saponinas, taninos e açúcares totais.

3.1.2 Determinações de caracteres físicos e pH do extrato hidroalcoólico

Para o extrato hidroalcoólico foram determinados os caracteres visuais (cor) e a determinação do pH, através de papel indicador pH (MERCK), com escala de precisão de 0,5.

3.1.3 Determinação de teor de sólidos (%)

Foi transferido para uma placa de petri tarada* 10 mL do extrato hidroalcoólico, levado ao banho-maria até secura. Após, colocou-se a placa de petri com o resíduo na estufa a 100 °C, durante 30 minutos, transferindo para o dessecador até esfriar. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foi pesada. Esse procedimento foi repetido diversas vezes, até obtenção de peso constante.

*Placa de petri tarada: foi levada uma placa de petri à estufa regulada em 100 °C durante 30 minutos; após foi colocada em um dessecador para esfriar e, em temperatura ambiente, a placa de petri foi pesada para posterior cálculo.

O cálculo do peso do teor de sólido % foi obtido pela correlação dos 10 mL do extrato hidroalcoólico utilizado e o peso representado em gramas:

$$\begin{array}{rcl} 20 \text{ g casca vegetal seca e estabilizada} & - & 100 \text{ mL de extrato hidroalcoólico} \\ X \text{ g} & - & 10 \text{ mL de extrato hidroalcoólico} \\ X = 2 \text{ g} \end{array}$$

A partir do valor de 2 g contidos em 10 mL de extrato, obteve-se o valor de teor de sólidos contido nessa alíquota. Esse valor foi extrapolado para porcentagem (correspondente a 100 g de casca vegetal seca e estabilizada).

$$\begin{array}{rcl} 2 \text{ g} & - & \text{valor do resíduo sólido obtido} \\ 100 \text{ g} & - & x \% \\ X = \% \text{ do resíduo sólido em } 100 \text{ g da casca} \end{array}$$

3.1.4 Obtenção das frações orgânicas

O restante do extrato hidroalcoólico (± 190 mL), foi transferido para um balão e concentrado no rotaevaporador (evaporador rotatório), até a redução do volume a 1/5 (± 40 mL).

O extrato concentrado foi transferido para um funil de separação e efetuou-se a extração líquido/líquido com solventes de polaridade crescente: n-hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol saturado com água.

1º - As frações orgânicas foram obtidas na extração líquido/líquido utilizando 20 mL do solvente extrator (n-hexano (F1), diclorometano (F2), acetato de etila (F3) e n-butanol (F4)), separadamente, 5 vezes repetidas para cada solvente, reservando a fase orgânica em recipientes rotulados;

2º - Terminado a extração com o 1º solvente, foi levado o extrato ao banho-maria, a 60 °C aproximadamente, até evaporação total do líquido extrator, após o extrato foi resfriado e continuada a extração com o segundo solvente;

3º - Foi repetida a 2º etapa a cada extração;

4º - O restante do extrato foi levado ao banho-maria até a evaporação total do último solvente extrator (n-butanol) e completado com etanol 70% até 100 mL, refazendo o extrato hidroalcoólico (F5).

Nas frações n-hexano (F1) e diclorometano (F2) foram pesquisados a presença de alcalóides, esteroides e/ou triterpenóides e frações geninas de heterosídeos; nas frações acetato de etila e n-butanol foram pesquisados alcalóides, aminogrupos, taninos e açúcares totais.

3.1.5 Pesquisas de metabólitos bioativos

Para a pesquisa dos metabólitos bioativos presentes na amostra vegetal (cascas), todos os reagentes utilizados foram preparados segundo Morita e Assumpção (1990).

3.1.5.1 Alcalóides:

Transferiu-se uma alíquota de 10 mL das frações (F1, F2, F3, e F4) para um funil de separação e extraído com 10 mL (2 vezes de 5 mL) de HCl solução a 1%. Reuniram-se os extratos clorídricos e dividiram-se em 5 tubos de ensaio (1 mL em cada tubo). Efetuou-se a pesquisa dos alcalóides com os reativos gerais (reativos de

Mayer, Bertrand, Bouchardat e Dragendorff). O 5º tubo foi utilizado como branco-referência.

Para a fração hidroalcoólica (F5) e extrato aquoso transferiu-se 10 mL para uma cápsula de porcelana, a qual foi levada ao banho-maria, a 60 °C aproximadamente, até evaporação completa. Foi adicionado ao resíduo 1 mL de etanol e 5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico a 1 %, filtrado e distribuído o extrato em 5 tubos de ensaios para testar a presença de alcalóides com gotas dos reativos gerais de Mayer, Bertrand, Bouchardat e Dragendorff. O 5º tubo foi usado como branco-referência.

A presença de precipitados ou turvação indica a positividade para alcalóides; uma vez que esses formam sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina, potássio, iodo, bismuto e outros metais, os quais são componentes dos reativos gerais para alcalóides. Também, são indicadas para evitar resultados falso-positivos extrações ácido/base, para purificação dos possíveis alcalóides presentes (SIMÕES *et al.*, 2010).

Para a purificação foi realizada extração por maceração “*over-night*” com cerca de 5 g do material vegetal em HCl 1%. O filtrado foi alcalinizado com NH₄OH até pH 10,0; extraído com diclorometano, evaporado até *secura* e o resíduo ressuspenso em cerca de 5 mL de HCl 1%, sendo utilizado para a confirmação do ensaio de alcalóides.

3.1.5.2 Aminogrupos:

Concentrou-se uma alíquota de 5 mL das frações F3, F4, F5 e aquoso, separadamente, em cápsula de porcelana até um volume final de aproximadamente 2 mL. Foi depositado cerca de 3 gotas dos extratos concentrados em cromatoplasmas de sílica gel, em pontos pré-determinados e adicionados sobre as manchas uma gota do reativo de Ninhidrina. As cromatoplasmas foram levadas à estufa, a 120 °C, durante 10 minutos. Observou-se o desenvolvimento de coloração em tons rosáceos a violáceos purpúreos, positivo para a presença de aminogrupos.

3.1.5.3 Esteróides e/ou triterpenóides:

Transferiu-se 10 mL das frações n-hexano e diclorometano para cápsulas de porcelana, evaporado até secura em banho-maria. Ao resíduo foram adicionados 5 mL de diclorometano em cada cápsula. Foram transferidas alíquotas de 0,1; 0,25 e 0,5 mL para tubos de ensaios, completando o volume para 2 mL com diclorometano, conforme o quadro 2. A reação de Liebermann-Buchard foi realizada com adição de 1 mL de anidrido acético e lentamente 3 a 5 gotas de H_2SO_4 concentrado. O desenvolvimento de coloração nos tubos foi observado.

Tubos	volume/mL	CH_2Cl_2	Anidrido acético	H_2SO_4
1	0,10	1,90	1,0	3 a 5 gotas
2	0,25	1,75	1,0	3 a 5 gotas
3	0,50	1,50	1,0	3 a 5 gotas

QUADRO 2 - REAÇÃO DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENÓIDES
FONTE: NAKASHIMA (1993).

Os esteróides desenvolvem colorações mutáveis com o tempo, enquanto os triterpenóides desenvolvem colorações estáveis. Desenvolvimento de coloração esverdeada é indicativo de presença de esteroides e ou /triterpenóides (SIMÕES *et al.*, 2010).

3.1.5.4 Taninos:

Foi concentrado 10 mL das frações acetato de etila, butanol e extrato hidroalcoólico à secura em banho-maria. Os resíduos foram ressuspensos com 5 mL de água destiladas. Os mesmos foram utilizados para a pesquisa dos taninos, o extrato aquoso não houve a necessidade de concentrar.

1º FeCl_3 a 1% - Transferido 1 mL de fase concentrada para um tubo de ensaio e adicionado 1 a 3 gotas da solução aquosa de FeCl_3 a 1%. Observado o desenvolvimento de coloração ou formação de precipitado.

2º $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ a 1% - Transferido 1 mL da fase concentrada para um tubo de ensaio e adicionado 1 a 3 gotas da solução aquosa 1% de sulfato de ferro amoniacal. Observado o desenvolvimento de coloração ou formação de precipitado.

3º Cloridrato de emetina a 1% - Transferido 1 mL da fase concentrada para um tubo de ensaio e adicionado 1 a 3 gotas da solução aquosa de cloridrato de emetina 1%. Observado a formação de precipitado ou turvação.

4º Solução de gelatina a 2,5 % em NaCl a 0,9% - Transferido para 3 tubos de ensaio alíquotas de 0,1 mL; 0,5 mL e 1,0 mL da fração concentrada e adicionar 2 mL da solução de gelatina 2,5%. Foram observados a formação de precipitados ou turvação.

5º Taninos hidrolisáveis e condensados

Do extrato aquoso foi transferido 25 mL do para um balão de refluxo e adicionado 4 mL de ácido clorídrico fumegante e 6 mL de formaldeído. O sistema foi acoplado ao condensador e deixado em refluxo durante uma hora sob aquecimento. Após, o extrato foi filtrado utilizando-se papel filtro.

No filtrado foi realizada a pesquisa de taninos hidrolisáveis, adicionando-se 100 mg de acetato de sódio (sem agitação) e gotas de solução aquosa a 1 % de cloreto férrico. Desenvolvimento de coloração sobre o acetato de sódio.

O precipitado no papel de filtro foi lavado com etanol a 70% e sobre este foi gotejado solução aquosa de hidróxido de potássio a 5%. Desenvolvimento de coloração no precipitado.

Os taninos são grupos que formam complexos com metais e proteínas, indicando positividade para os ensaios que apresentaram turvação ou precipitação.

3.1.5.5 Saponinas:

Transferiu-se para cápsulas de porcelana 15 mL dos extratos hidroalcoólico e aquoso e levados ao banho-maria para concentrar até 5 mL. Os concentrados foram transferidos para 3 tubos de ensaio, estes foram acidificados (pH 2), alcalinizados (pH 9) e um tubo deixado ao pH neutro e agitados energeticamente durante 3 minutos, com movimentos succionais. A altura da espuma formada foi mesurada logo após a agitação e depois do repouso de 30 minutos. O desenvolvimento de espuma persistente após repouso com altura superior a um centímetro é indicativo de presença de saponinas; as quais possuem propriedades emulsivas e formam espuma devido à alta tensão superficial das soluções aquosas.

3.1.5.6 Geninas e açúcares totais

Com as frações n-hexano (F1) e diclorometano (F2) foram realizados os ensaios de Keller-Kelliani e Baljet, para detecção de geninas.

1º Keller-Kelliani - foram transferidos alíquotas de 2 mL, separadamente, das frações F1 e F2 em cápsulas de porcelana e levado à secura em banho-maria. O resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Esses foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados, lentamente, 2 mL de H₂SO₄ concentrado. O desenvolvimento de coloração na zona de contato dos dois líquidos, e leve coloração azul ou verde na fase acética indica positividade para desoxi-açúcares.

2º Baljet – foram transferidos 2 mL, separadamente, das frações F1 e F2 em tubos de ensaio e adicionados 1 mL de solução de ácido pícrico 5% em etanol e 1 mL de hidróxido de sódio 10%. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de geninas com anel lactônico pentagonal insaturado.

Para as frações acetato de etila, butanol, hidroalcoólico e aquoso o conteúdo de açúcares totais foi detectado pelo método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico, com modificações (DUBOIS *et al.*, 1956).

Foram transferidos de cada fração e extrato 0,5 mL para tubos de ensaio, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 10% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 20 minutos, em temperatura de 25 °C a 30 °C e ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601, com detecção em 490 nm. Como branco-referência foi utilizada água destilada.

A detecção de absorbância pelas amostras indica a presença de açúcares totais, os quais foram quantificados após o processo extrativo para polissacarídeos (ITEM 3.3).

3.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de polifenóis foi determinado pelo método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, utilizado por Malinowski (2010). O método baseia-se na reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reativo Folin-Ciocalteu), em meio alcalino (carbonato de cálcio), em óxidos de tungstênio e molibdênio, causado pelas hidroxilas dos compostos fenólicos; formando um complexo de coloração azul (MORETONI, 2008).

Para tanto, foi preparado a partir de 1 g do material vegetal seco e estabilizado o extrato acetônico, em aparelho de ultra-som, com renovação do solvente (cerca de 30 mL de acetona 80%) a cada hora, por 3 vezes seguidas. O extrato filtrado foi envasado em frasco âmbar e completado para 100 mL, resultando na concentração final de 1 g%.

Alíquotas de 1 mL de extrato acetônico foram transferidos para tubos de ensaio, adicionados 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 20% (Na₂CO₃) e q.s.p. 10 mL de água destilada. As amostras foram preparadas em triplicata e mantidas à temperatura ambiente, por 20 min após a adição do último reagente, para a leitura em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu

1601, com comprimento de onda de 735 nm. Como branco-referência foi utilizada água destilada.

Para a elaboração da curva analítica foram utilizados soluções aquosas de ácido gálico, nas concentrações de 10 a 100 µg/mL, com o mesmo procedimento utilizado para o extrato acetônico. Por meio da equação da reta substituiu-se o valor de y pelas absorbâncias obtidas das amostras e quantificou-se o conteúdo fenólico total. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais).

3.2.1 Determinação de taninos totais

Para a determinação de taninos totais foram utilizados os métodos descritos na FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4ª e 5ª edição, com modificações pelo autor.

Ambos os métodos são espectrofotométricos. As amostras foram preparadas em triplicatas, a partir de cascas secas e estabilizadas. Como branco-referência foi utilizada água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601.

3.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Para a extração de polissacarídeos foi utilizado o mesmo material seco e estabilizado, conforme descrito no perfil fitoquímico (ITEM 3.1).

Foram utilizadas técnicas descritas em literatura para extração de polissacarídeos, iniciando com a deslipidificação e despigmentação do material, por meio de extração com solventes apolares e uso do aparelho de Soxhlet em baixas temperaturas. Em sequência, foi realizada a extração de diferentes tipos de polissacarídeos, segundo suas características, sob-refluxo em banho-maria, com solventes extratores de polaridade crescente, até extração aquosa e alcalina. O esquema geral da extração de polissacarídeos está ilustrado abaixo (Figura 6).

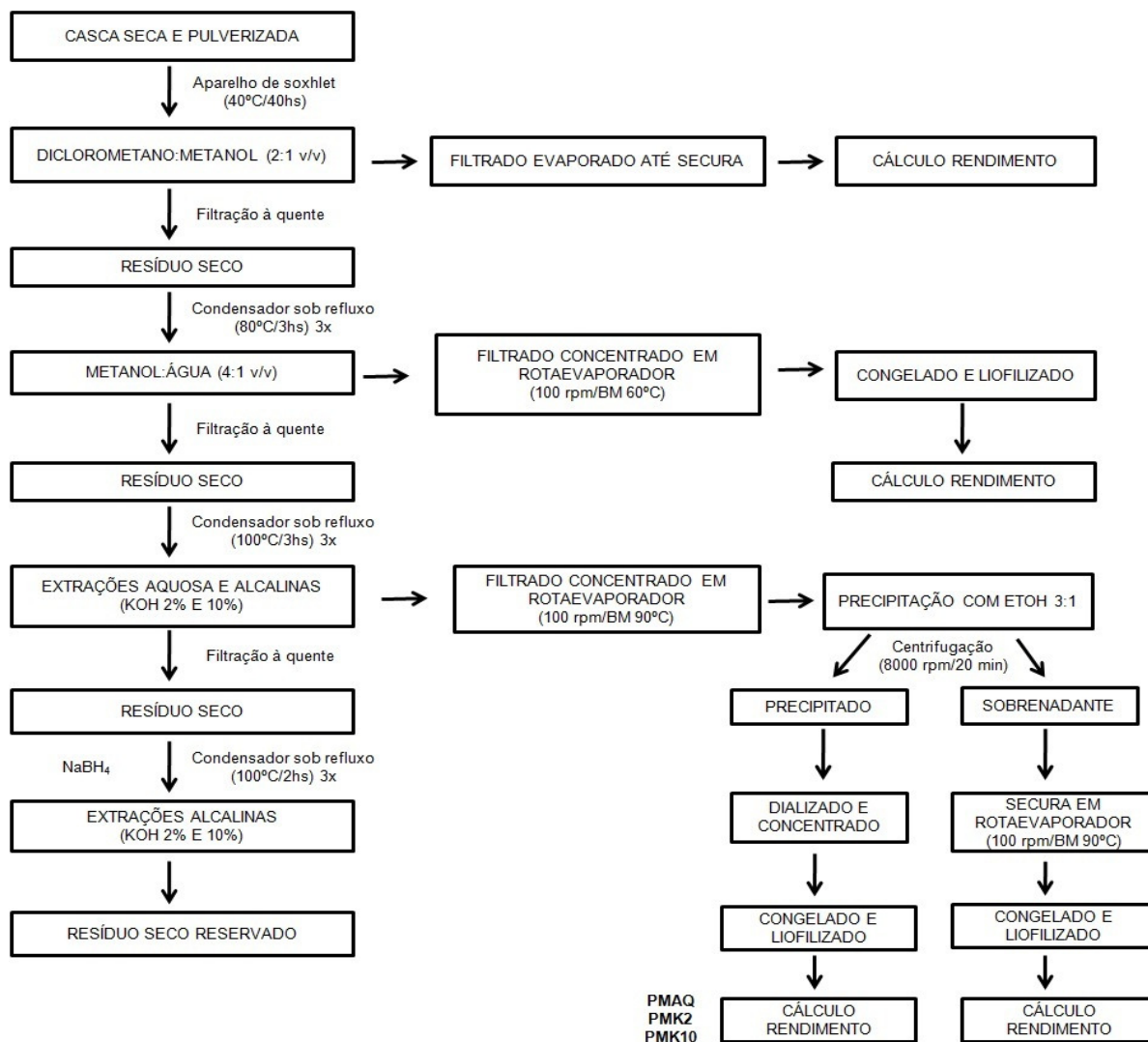


FIGURA 6 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS
FONTE: O autor (2010)

3.3.1 Extração com diclorometano-metanol

A amostra seca e pulverizada (300 g total) foi deslipidificada com uma mistura diclorometano-metanol (2:1, v/v, aproximadamente 300 mL), em Soxhlet, durante aproximadamente 40 h a 40 °C. O material residual seco foi separado por filtração e

submetido ao próximo processo extrativo. A deslipidificação foi realizada conforme Moretoni (2008), com modificações.

3.3.2 Extração com metanol-água

O resíduo seco da extração anterior (Item 3.2.1) foi submetido à extração com metanol-água (4:1, v/v, aproximadamente 200 mL cada vez), com auxílio de condensador sob-refluxo, em banho-maria a 80 °C, por 3 horas. Esse procedimento foi repetido três vezes e a cada etapa o extrato foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 60 °C), congelado e liofilizado para cálculo do rendimento. O material residual foi seco e submetido ao próximo processo extrativo (CIPRIANI, 2003), com modificações.

3.3.3 Extração aquosa

O material residual da extração anterior (Item 3.2.2) foi submetido à extração aquosa (aproximadamente 200 mL cada vez), com auxílio de condensador sob-refluxo, em banho-maria a 100 °C, por 3 horas. Esse procedimento foi repetido três vezes e, a cada etapa o extrato foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C) até um volume reduzido e precipitado com etanol absoluto (3:1).

O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm/ 20 min), dialisado contra água destilada, em béquero sob agitação mecânica, com trocas de água de 4 em 4 horas, aproximadamente, durante 12 horas de diálise. Utilizou-se membrana de celulose regenerada Spectrapoor® (3000 Da).

O material dialisado foi concentrado até pequeno volume em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C), congelado e liofilizado para cálculo do rendimento. Essa fração foi denominada PMAQ (CIPRIANI, 2003), com modificações.

3.3.4 Extração alcalina com KOH 2%

O material residual da extração anterior (Item 3.2.3) foi submetido à extração alcalina com KOH 2% (aproximadamente 200 mL por vez), adicionando-se boroidreto de sódio (NaBH_4) na primeira extração para evitar a degradação dos polissacarídeos a partir de suas extremidades redutoras. Para a extração sob-refluxo foi utilizado um condensador, em banho-maria a 100 °C durante 2 horas; o procedimento foi repetido três vezes. Em cada etapa o extrato foi filtrado a quente, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C) e precipitado com etanol absoluto (3:1).

O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação, (8000 rpm/ 20 min), dialisado contra água destilada, em béquer sob agitação mecânica, com trocas de água de 4 em 4 horas, aproximadamente, durante 12 horas de diálise. Utilizou-se membrana de celulose regenerada Spectrapoor® (3000 Da).

O material dialisado foi concentrado até pequeno volume em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C), congelado e liofilizado para cálculo do rendimento. Essa fração foi denominada PMK2 (CIPRIANI, 2003; MORETONI, 2008) com modificações.

3.3.5 Extração alcalina com KOH 10%

O material residual da extração anterior (Item 3.2.4) foi submetido à extração alcalina com KOH 10% conforme o procedimento descrito para a extração alcalina com KOH 2%. A única diferença é que não foi utilizado NaBH_4 nessa etapa de extração.

Em cada etapa o extrato foi filtrado a quente, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C) e precipitado com etanol absoluto (3:1).

O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm/ 20 min), mesmo procedimento anterior.

O material dialisado foi concentrado em rotaevaporador (100 rpm, em banho-maria a 90 °C) até pequeno volume, congelado e liofilizado para cálculo do rendimento. Essa fração foi denominada PMK10 (CIPRIANI, 2003; MORETONI, 2008), com modificações.

3.4 AÇÚCARES TOTAIS

O conteúdo de açúcares totais foi determinado pelo método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), com modificações.

Para a quantificação dos açúcares totais foi realizada uma curva analítica com glucose (Merck®) e frutose (Henrifarma®) como padrões-referência (1 mg/mL), na proporção 1:1, diluídos em concentrações de 10 a 100 µg/mL. Para cada diluição realizada foram transferidos 0,5 mL para tubos de ensaio, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 10% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 20 minutos, em temperatura de 25 °C a 30 °C e ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601, com detecção em 490 nm. As amostras foram preparadas em triplicata, como branco-referência foi utilizada água destilada.

As frações denominadas PMAQ, PMK2 e PMK10 foram diluídas em água, na concentração de 1 mg/mL. Dessas diluições foram transferidos 0,5 mL para tubos de ensaio, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 10% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 20 minutos, em temperatura de 25 °C a 30 °C e ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas conforme procedimento para elaboração da curva analítica, as amostras foram preparadas em triplicata. Por meio da equação da reta as concentrações foram quantificadas com relação às absorbâncias de açúcares totais.

3.5 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Para pesquisa da composição monossacarídica foram utilizadas as frações PMAQ, PMK2 e PMK10, as quais foram submetidas aos processos de hidrólise ácida, redução e acetilação, descritos a seguir.

Aproximadamente 2 mg das amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram hidrolisadas com cerca de 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA), em diferentes condições de tempo, temperatura e molaridade do TFA. As amostras foram mantidas em estufa; após foi adicionado q.s. de água destilada e as amostras foram congeladas e liofilizadas, para eliminação do ácido.

As condições de hidrólise utilizadas foram as seguintes (Quadro 3):

Condições	Tempo (h)	Temperatura (°C)	TFA (mol. L ⁻¹)
1	8	120	4
2	4	110	2
3	3	100	1
4	1	100	2

QUADRO 3 - CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE

FONTE: O autor (2011)

Os liofilizados foram ressuspensos em q.s. de água destilada e reduzidos com NaBH₄ em temperatura ambiente, pH 10, *over-night*. Para a purificação dos alditóis correspondentes, foram adicionados às soluções gotas de ácido acético glacial, para neutralização da solução (pH 5,0 – 6,0). Após foi adicionado q.s. de água destilada e as amostras foram congeladas e liofilizadas.

O borato formado foi eliminado na forma volátil de borato de trimetila, por meio de sucessivas co-destilações com metanol e evaporação em rotaevaporador com aquecimento em banho-maria (cerca de 3 a 5 vezes cada). Os alditóis foram acetilados com 1 mL de anidrido acético a 120 °C/1 h. O procedimento foi interrompido por adição de q.s. de água e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio.

A extração clorofórmica foi purificada com sucessivas lavagens de hidróxido de sódio saturado, até pH próximo do neutro (cerca de 3 a 5 vezes cada). Logo após, lavagens com água foram realizadas sucessivas vezes (cerca de 6 a 8 vezes cada), e a fração clorofórmica foi evaporada em temperatura ambiente, para análise por cromatografia gasosa (WOLFROM e THOMPSON, 1963a; 1963b).

Para análise foi utilizado o cromatógrafo CG Ultra, com rampa de aquecimento de 100 °C – 230 °C, 60 °C /min, detector de ionização em chamas (FID), Hélio e Nitrogênio como gás de arraste, 1 mL/min. As amostras foram solubilizadas em q.s. de acetona, analisadas e comparadas com os padrões de monossacarídeos, nas mesmas condições.

3.6 DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS

Para a detecção e quantificação de ácidos urônicos foi utilizado o método espectrofotométrico de Filisetti-Cozzi e Carpita, com modificações (1991).

As amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg/mL. Foram transferidos em tubos de ensaio 0,4 mL dessas diluições, separadamente para cada amostra, 0,04 mL de solução de sulfamato de potássio 4 mol. L⁻¹ e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio 75 mmol. L⁻¹. Os tubos foram agitados, tampados com material de vidro e incubados em banho-maria fervente durante 20 minutos. Após, os tubos foram resfriados, destampados, adicionados de 0,08 mL de solução de m-hidroxibifenil na concentração aproximada de 1,7 mg/mL (preparada em NaOH 0,5% previamente ao ensaio) e agitados levemente. Decorridos 5 minutos de incubação após adição da última solução, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm. As amostras foram preparadas em triplicata, como branco foi utilizada água destilada.

Para cada amostra foi preparado um branco referência, porém sem adição da última solução (m-hidroxibifenil), sendo seu volume substituído por NaOH 0,5%.

Uma curva analítica foi preparada com diluições de ácido galacturônico, em concentrações de 2 a 30 µg/mL, tratada de igual maneira às amostras; com isso obteve-se a equação da reta. Os resultados de absorbância das amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram substituídos no valor de y da equação da reta e assim detectou-se a quantidade de ácidos urônicos presente nas amostras.

3.7 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE

As amostras das frações polissacarídicas PMAQ, PMK2 e PMK10 foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 mol. L^{-1} na concentração de 1 mg/mL, e ultrafiltradas em membranas de éster de celulose de 0,2 μm . Após, foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão molecular de alta pressão (HPSEC), equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F.

Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação em série com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g. mol^{-1} . Como eluente foi utilizado o mesmo reagente para solubilização, NaNO_2 0,1 mol. L^{-1} , com fluxo de 0,6 mL/min.

3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O método espectrofotométrico descrito por Lowry (1951), com modificações, foi utilizado para dosagem de proteínas totais.

As amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg/mL. Alíquotas de 0,5 mL das diluições foram transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 5 mL de uma mistura reativa, preparada da seguinte maneira: 100 mL de solução aquosa com 20 g de carbonato de sódio anidro e 4 g de NaOH; 1 mL de solução aquosa com 0,02 g de sulfato de cobre e 1 mL de solução aquosa com 0,04 g de tartarato de sódio. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e adicionados 0,5 mL de Folin-Giocalteau 1N, sendo incubados por mais 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm. As amostras foram preparadas em triplicata, como branco foi utilizado água destilada.

Para quantificação dos resultados foi preparada uma curva analítica com solução aquosa de albumina (0,06 a 0,18 $\mu\text{g/mL}$), sendo que as diferentes concentrações preparadas foram tratadas de igual maneira às amostras. Os resultados de absorbância das amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram substituídos

no valor de y da equação da reta e assim detectou-se a quantidade de proteínas presentes nas amostras.

3.9 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

O extrato aquoso liofilizado para incorporação nas formulações semi-sólidas foi preparado conforme metodologia descrita no item 3.1.1, com algumas modificações. Foram utilizados como solventes extratores etanol 70%, etanol 50% e água destilada, sucessivamente e até completa exaustão do material vegetal, com renovações do solvente (cerca de 2 a 3 vezes para cada solvente) e filtrações a quente. Posteriormente o extrato foi concentrado em rotaevaporador (100 rpm/80 °C aproximadamente), congelado e liofilizado.

Foram preparadas formulações de alta lipofilia (pomada), intermediária lipofilia e hidrofilia (emulsão tipo creme), e alta hidrofilia (gel). Cada formulação foi preparada em triplicata; exceto o gel, o qual foi preparado em duplicata devido à disponibilidade do extrato liofilizado. As duas diferentes concentrações do extrato liofilizado utilizadas foram de 5 mg/g e 10 mg/g, referentes à quantidade de extrato liofilizado (em mg) para o total preparado para cada formulação (em g).

A execução do estudo de estabilidade para as formulações produzidas neste trabalho não foi possível. Para tanto se faz necessário o doseamento de ativos, os quais ainda não foram estabelecidos nessa etapa de pesquisa da espécie. Portanto, optou-se por realizar uma avaliação preliminar do comportamento das formulações frente à temperatura e embalagens, para avaliar as condições físicas das preparações.

As formulações também foram avaliadas com relação ao comportamento físico em dois diferentes tipos de embalagem – plástico e alumínio – e em diferentes condições de armazenamento – a 40 °C \pm 2 °C (temperatura estressante), em comparação com amostras deixadas em temperatura de 25 °C \pm 2 °C; encarada como temperatura controle neste trabalho (figura 7).

As embalagens plásticas utilizadas foram do tipo pote plástico de fundo falso, com capacidade de 60 mL. O material do pote e tampa é polipropileno, com batoque de polietileno de baixa densidade, e dimensões de 57 cm de altura (pote e tampa)

por 52 cm de diâmetro interno. As embalagens de alumínio utilizadas foram do tipo bisnaga de alumínio, com capacidade de 60 g, dimensões de 3,0 cm (diâmetro interno) por 14,5 cm. O material externo tem como composição esmalte poliéster branco e interno, verniz dourado.

As amostras determinadas para avaliação preliminar foram analisadas nos tempos de 0, 7, 14, 30, 60, 90 e 180 dias; com relação aos caracteres físicos (aspecto, cor e odor) e pH; de maneira a avaliar o comportamento físico das formulações (Figura 7).

Para aferição do pH, alíquotas da pomada, creme e gel foram retiradas e analisadas diretamente em pHmetro, da marca Gehaka, previamente verificado com soluções padrões de pH 7,01 e 4,01. As amostras retiradas da estufa foram previamente deixadas em ambiente até que ocorresse estabilização da temperatura.

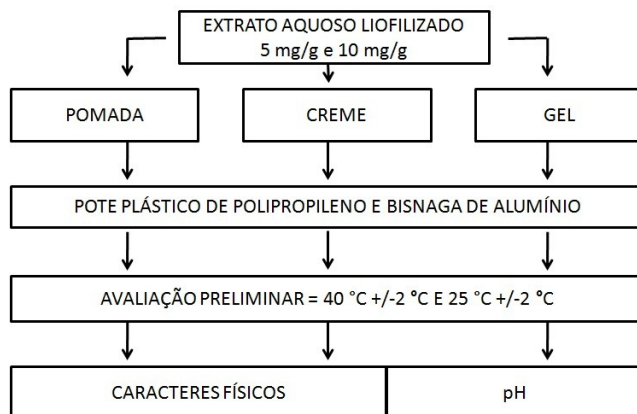


FIGURA 7 - ESQUEMA PARA A PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

FONTE: O autor (2011)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PERFIL FITOQUÍMICO

O extrato hidroalcoólico preparado apresentou coloração castanha avermelhada, pH 5,5 e teor de sólidos de 9,23 g%.

Durante o preparo do extrato aquoso, foi observado aspecto mucilaginoso, fator que dificultou a filtração. Para facilitar essa etapa, a partir do material vegetal inicial realizaram-se extrações sequenciais com etanol 50 %, de uma a duas vezes, para então realizar a extração com água destilada. A cada extração o extrato foi separado do resíduo por filtração a quente e os filtrados foram recolhidos e armazenados no mesmo frasco.

De acordo com o quadro 4, observam-se os principais metabólitos secundários presentes em diferentes extratos e frações da casca de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp.

Metabólitos secundários	Hexano	Diclorometano	Acetato de Etila	n-Butanol	Extrato hidroalcoólico	Extrato Aquoso
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Aminogrupos	*	*	+++	+++	+++	+++
Esteróides/ Triterpenóides	+++	+++	*	*	*	*
Taninos	*	*	+++	+++	+++	+++
Saponinas	*	*	*	*	+	+
Geninas e Açúcares totais	++	++	++	++	++	+++

QUADRO 4 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CASCAS DE *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP

FONTE: O autor (2010)

NOTA: - negativo, + fracamente positivo, ++ positivo, +++ fortemente positivo, *não realizado

Conforme a análise fitoquímica, observa-se a forte presença de aminogrupos e taninos nas frações de maior polaridade e extratos, juntamente com a presença de açúcares totais em todas as frações e forte presença no extrato aquoso. As saponinas foram fracamente detectadas nos extratos hidroalcoólico e aquoso. Nas frações apolares verificou-se a forte presença de esteróides e/ou triterpenóides.

Foi confirmada a ausência de alcalóides em todas as frações e extratos e na fração diclorometânica purificada, conforme descrito no item 3.1.5.1 de MATERIAIS E MÉTODOS.

Com relação aos taninos, observou-se uma concentração de precipitado no ensaio com formol-clorídrico, e forte presença de taninos condensados na espécie.

Os resultados são coerentes com a literatura, evidenciando a possível relação dos aminogrupos, esteroides e ou/triterpenóides, taninos, saponinas e açúcares totais com a ação cicatrizante apresentada pela espécie.

4.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

De acordo com a equação da reta apresentada na curva analítica de fenólicos totais (Figura 8), obteve-se a concentração de fenólicos totais presentes no material vegetal pesquisado, equivalentes ao padrão de ácido gálico utilizado.

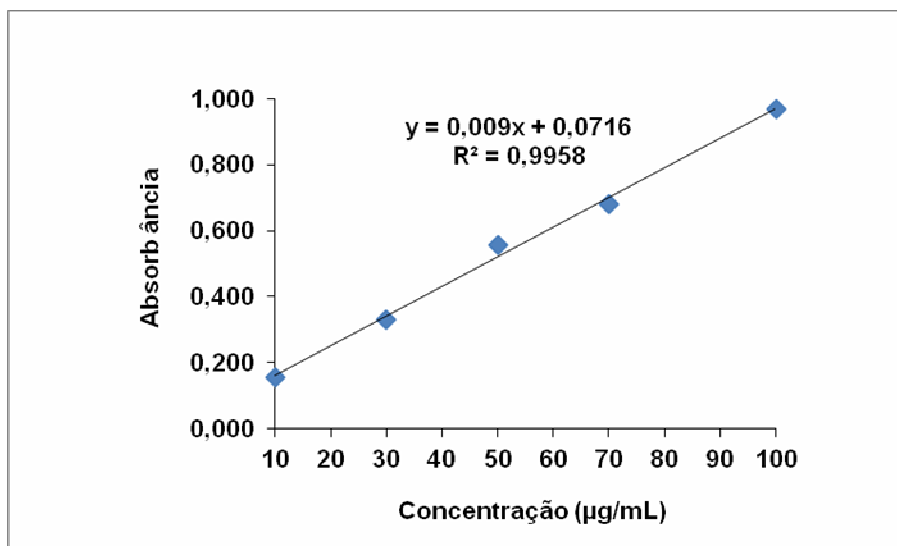


FIGURA 8 - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS
FONTE: O autor (2011)

A concentração média de fenólicos totais obtida foi de 1274,07 mg equivalentes de ácido gálico/100 g amostra, com variação de $\pm 74,07$ mg. Esse valor extrapolado para g% apresenta 1,27 g equivalentes de ácido gálico/100 g amostra.

O conteúdo fenólico presente na amostra era esperado, indicando positividade para taninos, e também pela estrutura do material vegetal utilizado, rico em ligninas para suporte e sustentação estrutural. A presença de ligninas em plantas lenhosas e em espécies da família Lauraceae é representativa e vêm sendo pesquisada principalmente nos gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea* (SIMÕES *et al.*, 2010).

4.2.1 Determinação de taninos totais

Para a determinação de taninos totais foram utilizadas duas metodologias diferenciadas, descritas na Farmacopéia Brasileira 4ª e 5ª edição. Ambos os métodos se baseiam na reação de redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reativos Folin-Ciocalteu e Folin-Denis), em meio alcalino (carbonato de sódio), em óxidos de tungstênio e molibdênio, ocasionado pelas hidroxilas dos compostos tânicos, formando complexos de coloração azul. Além disso, os métodos utilizam pó-de-pele como agente protéico para complexação de taninos, subtraindo a fração não tanante para cálculo da concentração de taninos totais. O resultado é expresso em porcentagem de taninos totais equivalentes à substância referência pirogalol (MORETONI, 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

A principal diferença entre os métodos é o reagente utilizado. A Farmacopéia Brasileira 4ª edição utiliza o reagente Folin-Denis, composto por tungstato de sódio, ácido fosfomolibdico e ácido fosfórico, de cor esverdeada. A 5ª edição faz uso do reagente Folin-Ciocalteu, de composição igual ao primeiro reagente adicionada de sulfato de lítio (para evitar a formação de precipitados), de cor amarela (VERZA, 2006).

De acordo com o uso do reagente Folin-Denis, a concentração de taninos totais presente no material vegetal foi de 3,41 g% em equivalentes de pirogalol, com variação de $\pm 0,59$ g. E de acordo com a metodologia utilizando Folin-Ciocalteu obteve-se 0,66 g% de taninos totais em equivalentes de pirogalol, com variação de $\pm 0,05$ g.

O reagente Folin-Denis apresenta menor sensibilidade e detecção em 735 nm, ou comprimentos de onda aproximados (715 nm de acordo com a FARM.

BRAS. IV edição); porém seu tempo de leitura é menor, cerca de 2 a 3 minutos após a adição do último reagente no ensaio. Com isso evidencia-se a formação de complexos instáveis pelo reagente. O reagente Folin-Ciocalteu é mais sensível quando comparado ao Folin-Denis, sendo detectado em comprimento de onda de 760 nm, com formação de complexos estáveis no tempo de 30 minutos (VERZA, 2006).

Em um estudo prévio envolvendo a dosagem tânica da espécie, obtiveram-se valores entre 8% e 9,4%, expressos em equivalentes de pirogalol. Tal pesquisa ressaltou a diferença entre os dois reagentes citada, a diferença de comportamento dos reagentes frente a diferentes taninos, e a interferência de compostos como açúcares e ácidos orgânicos na detecção espectrofotométrica (MARANHO, 1998). Além disso, fatores como métodos de extração, época de coleta, técnica de armazenamento e condições do solo podem interferir na composição química das espécies (MALINOWSKI, 2010).

O carvalho (*Quercus robur* L.), espécie vegetal com composição tânica na casca, apresenta no mínimo 3,0 % de taninos na droga seca. O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) um mínimo de 8 % de taninos nas cascas secas. A hamamelis (*Hamamelis virginiana* L.) contém teor mínimo de 7,0 % de taninos nas folhas secas. As raízes secas de ratânia (*Krameria triandra* Ruiz e Pavon) possuem no mínimo 10,0 % de taninos. Todos os teores apresentados são expressos com relação ao pirogalol (CUNHA, 2010; FARM. BRAS., 2010).

Conforme os resultados apresentados e os teores tânicos de outras espécies vegetais, especialmente o carvalho e o barbatimão que apresentam taninos na casca; os valores obtidos por meio das duas metodologias se apresentam baixos e com grande variação. Esses interferentes devem-se principalmente ao tipo de reagente utilizado, em cada metodologia e a sensibilidade apresentada por cada um; bem como, a utilização do peso do material vegetal sem considerar a determinação de água, indicada para o cálculo de taninos totais. Tal análise não foi realizada pela indisponibilidade do material vegetal “*in natura*”, uma vez que, foi disponibilizado um material seco e estabilizado para o desenvolvimento desta pesquisa.

O teor de 0,66 g% obtido por meio do reagente Folin-Ciocalteu para taninos totais se apresenta dentro do valor obtido para fenólicos totais (1,27 g%), com uso do mesmo reagente. Porém ressalta-se que os ensaios citados são metodologias

diferentes, com uso de diferentes padrões, ácido gálico para fenólicos e pirogallol para taninos totais, não sendo possível uma comparação.

4.3 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Para a extração de polissacarídeos todas as frações em cada etapa extrativa foram liofilizadas ou evaporadas até *secura* para cálculo do rendimento. De acordo com a tabela 1 observa-se que o somatório dos rendimentos e resíduo vegetal final está próximo de cem por cento, sendo a pequena diferença em porcentagem (cerca de 4%) decorrente de perdas que possam ter ocorrido durante o processo.

TABELA 1 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRATIVAS

Solventes extratores	Rendimento (%)
Diclor:MeOH	3,38
MeOH:H ₂ O	5,76
Aquosa	4,39
KOH 2 %	22,31
KOH 10 %	10,73
Resíduo vegetal	49,77
Total	96,34

FONTE: O autor (2011)

Analisando os rendimentos pode-se esperar uma maior constituição de hemiceluloses e celulosas no material vegetal, pois as extrações alcalinas (KOH 2 % e KOH 10 %) apresentaram maior rendimento extrativo. Também esse rendimento alcalino pode ser justificado pela estrutura do material vegetal utilizado, uma vez que a casca do lenho é rica em açúcares do tipo celulose e hemicelulose; juntamente com compostos de natureza fenólica como ligninas; presentes na parede celular de tecidos associados a caule, folha e raiz dos vegetais, conferindo rigidez a esses órgãos (SIMÕES *et al.*, 2010).

4.4 AÇÚCARES TOTAIS

A figura 9 apresenta a curva analítica para dosagem de açúcares totais, o qual apresentou coeficiente de determinação (R^2) próximo de 1, indicando uma ótima correlação das variáveis.

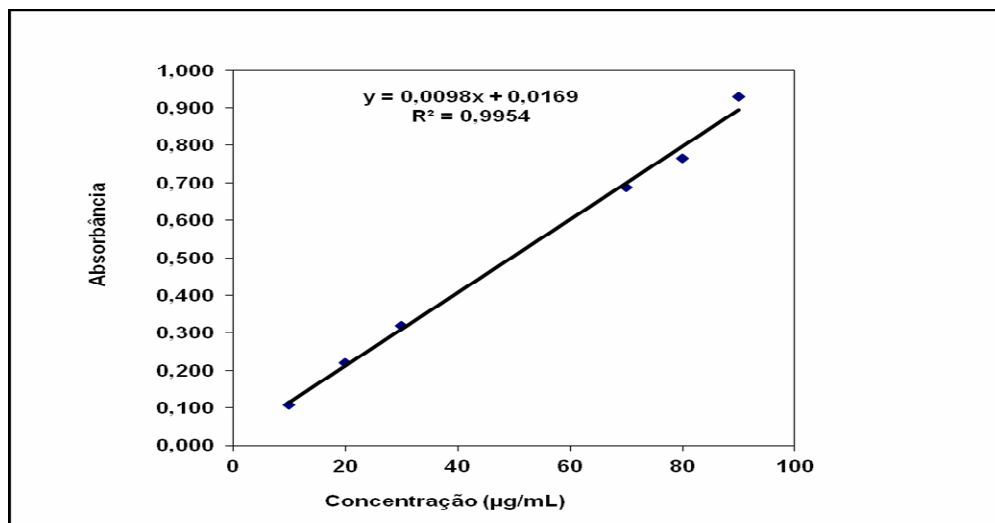


FIGURA 9 - CURVA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS
FONTE: O autor (2011)

Por meio da equação da reta os valores de absorbância das amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foram substituídos no valor de y, resultando na concentração de açúcares totais. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

Amostras	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração (%)
PMAQ	326,88	$\pm 27,81$	65,38
PMK2	227,02	$\pm 2,49$	45,40
PMK10	318,62	$\pm 7,51$	63,72

FONTE: O autor (2011)

Para as três amostras a presença de açúcares totais é representativa, justificando a continuidade desse trabalho no intuito de pesquisar a composição de monossacarídeos e polissacarídeos.

4.5 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS

Para análise da composição monossacarídica foram analisadas as amostras PMAQ, PMK2 e PMK10, hidrolisadas, reduzidas e acetiladas, na forma de acetato de alditol. Os resultados de cromatografia gasosa da composição monossacarídica, juntamente com a dosagem espectrofotométrica de ácidos urônicos, estão representados na tabela 3.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS

Amostras	Condições ¹	Composição monossacarídica (%)							Ác.Ur. ³ (%)
		Rham ²	Fuc ²	Ara ²	Xil ²	Man ²	Gal ²	Glu ²	
PMAQ	1	42,05	10,86	33,32	10,20	1,79	1,78	-	11,22
	2	3,72	0,07	53,55	28,85	0,65	3,15	10,02	
	3	5,00	0,05	54,86	25,69	0,64	2,62	11,15	
	4	3,34	0,05	55,83	28,01	0,70	3,35	8,69	
PMK2	1	19,52	16,95	56,53	-	5,72	1,28	-	7,68
	2	15,14	0,06	33,59	18,27	0,91	6,82	25,21	
	3	0,32	25,30	47,10	9,41	-	3,38	12,94	
	4	19,92	0,52	37,36	13,79	0,93	7,17	19,48	
PMK10	1	30,81	26,42	39,10	-	1,13	1,01	1,54	1,90
	2	1,57	0,14	8,08	72,10	0,26	2,19	15,47	
	3	9,21	-	18,68	53,73	0,13	2,00	16,26	
	4	5,43	0,71	19,30	59,77	0,42	1,57	12,58	

FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Condições: 1 – TFA 4M/120°C/8 h; 2 – TFA 2M/110°C/4 h; 3 – TFA 1M/100°C/3 h; 4 – TFA 2M/100°C/1 h. ²Monossacarídeos: Ramnose, Fucose, Arabinose, Xilose, Manose, Galactose, Glucose. ³ Ácidos Urônicos.

As amostras foram submetidas a diferentes condições de hidrólise, pois a condição 1 utilizada foi considerada muito estressante, sendo desconsiderados os resultados obtidos por meio dessa condição.

Com relação à composição monossacarídica, a amostra PMAQ mostrou-se homogênea frente às condições 2, 3 e 4 de hidrólise, apresentando resultados semelhantes. Para essas condições nota-se a maior composição em arabinose e xilose, podendo indicar a possível estrutura de uma arabinoxilana; já relatada no gênero *Persea*, em extração aquosa (GOWDA *et al.*, 1988).

Para a amostra PMK2 evidencia-se falta de homogeneidade em sua composição, não podendo deduzir nenhum resultado conclusivo de sua composição monossacarídica. Procedimentos de purificação para polissacarídeos nessa amostra seriam interessantes, para elucidá-la satisfatoriamente.

A amostra PMK10 apresentou nas três condições consideradas uma alta porcentagem de xilose, seguida de glucose e arabinose, indicando as prováveis estruturas xilanas, arabinoxilanas e xiloglucanas. Esses são componentes polissacarídicos inseridos no grupo das hemiceluloses, obtidos por extrações alcalinas, sendo coerente com a literatura (CIPRIANI, 2003). Além disso, as xilanas são os polímeros mais abundantes na parede celular dos vegetais, apresentando grande diversidade estrutural e ligações com a celulose e ligninas. As xilanas são utilizadas industrialmente como fonte de fibras solúveis (DEY e HARBORNE, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

A amostra PMAQ apresentou maior porcentagem de ácidos urônicos; o que pode ser justificado pela possível presença de polissacarídeos pécticos nas paredes celulares, ricos em ácidos urônicos, que são facilmente detectados em extrações aquosas (CIPRIANI, 2003).

4.6 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE

Na análise para determinação de homogeneidade foram utilizadas as amostras polissacarídicas PMAQ, PMK2 e PMK10. Após solubilização em NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ na concentração de 1 mg/mL e ultrafiltração em membranas de éster de celulose de $0,2 \mu\text{m}$, as amostras foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão molecular de alta pressão (HPSEC), sendo detectados por índice de refração e espalhamento de luz.

A detecção por espalhamento de luz faz referência ao tamanho molecular; o índice de refração relaciona a concentração de determinada estrutura presente na amostra.

A figura 10 apresenta o perfil de eluição da amostra PMAQ, de acordo com o cromatograma nota-se no tempo entre 35 e 40 minutos a detecção de apenas uma estrutura com picos que são sobrepostos. No intervalo entre 65 e 70 minutos observa-se por meio do detector de índice de refração a presença de algum provável sal contaminante na análise.

Todas as amostras foram consideradas heterogêneas, sendo indicados processos de purificação para obtenção de resultados homogêneos. A amostra

PMAQ é abaixo ilustrada, a qual apresentou cromatogramas com melhor resolução de picos, quando comparados aos demais resultados.

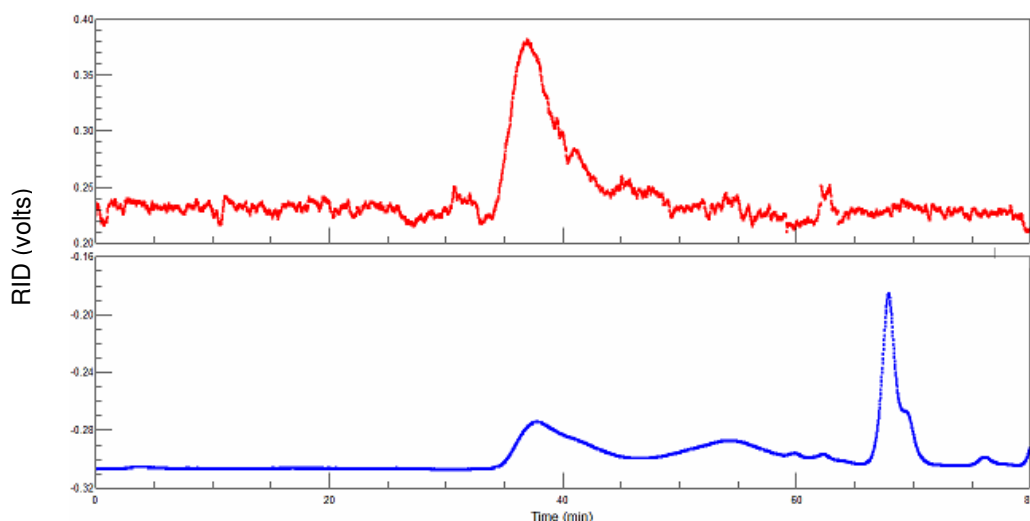


FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA PMAQ EM ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE, POR HPSEC

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Cromatograma superior (linha vermelha) representa o espalhamento de luz e o inferior (linha azul), o índice de refração.

4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Proteínas são macromoléculas biológicas que ocorrem em todas as células. Apresentam grande variedade, diferentes tamanhos, desde pequenos peptídeos até polímeros com massa molar de milhões e alta diversidade de funções biológicas (LEHNINGER, 2006). São presentes na parede celular vegetal, chamadas de proteínas estruturais, ricas em prolina, hidroxiprolina e glicina. Além disso, exercem importante papel na arquitetura das paredes celulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

Abaixo está representada a curva analítica (Figura 11) e a concentração em porcentagem de proteínas (Tabela 4) nas amostras PMAQ, PMK2 e PMK10.

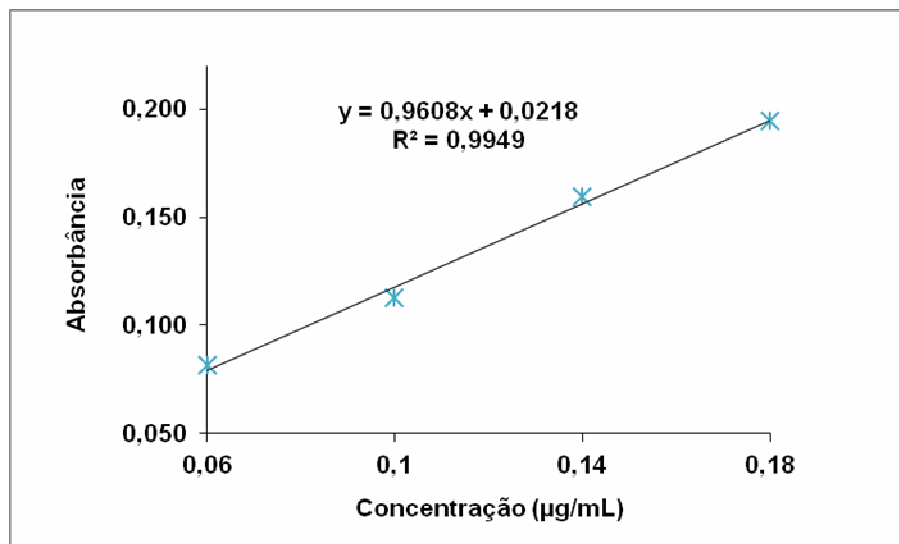


FIGURA 11 - CURVA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS
 FONTE: O autor (2011)

TABELA 4 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Amostras	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração (%)
PMAQ	0,47	$\pm 0,03$	0,09
PMK2	1,02	$\pm 0,10$	0,20
PMK10	0,33	$\pm 0,02$	0,07

FONTE: O autor (2011)

Conforme a tabela 4 nota-se uma mínima presença de proteínas nas amostras, sendo encarados os resultados como complementares para a identificação química das amostras. Tais resultados podem ser provenientes de desnaturação protéica que o material sofreu durante as extrações alcalinas; somente para as amostras PMK2 e PMK10; da precipitação com etanol absoluto, realizada para as três amostras, e também por meio das altas temperaturas utilizadas durante os processos extrativos das amostras PMAQ, PMK2 e PMK10.

Desnaturação é a perda da estrutura tridimensional de uma proteína, com consequente perda de atividade biológica. As proteínas tendem a apresentar desnaturação frente a condições de calor, extrema variação de pH e em contato com solventes orgânicos miscíveis, como o etanol. O calor interfere nas interações fracas em uma proteína, em especial as ligações de hidrogênio. Variações de pH alteram a carga nas proteínas, ocasionando repulsão estática e também ruptura de ligações de hidrogênio. Os solventes orgânicos atuam rompendo as interações hidrofóbicas,

desestruturando o núcleo estável de proteínas globulares (múltiplas cadeias polipeptídicas enoveladas) (LEHNINGER, 2006).

Uma alternativa para a determinação protéica da espécie seria a realização desse ensaio espectrofotométrico utilizando a amostra liofilizada da extração com MeOH:H₂O (2:1), descrita no Item 3.2.2 em MATERIAIS E MÉTODOS. Essa amostra apresenta-se deslipidificada e com menor exposição às condições desnaturantes relatadas.

4.8 FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

Com relação à avaliação dos caracteres físicos, os resultados para as amostras que permaneceram inalteradas durante o estudo são apresentados somente nos tempos inicial e final. Para as amostras que sofreram interferência nessa análise, os resultados são apresentados de maneira detalhada.

O valor de pH é definido como a medida da atividade do íon hidrogênio de uma solução ou amostra. Para todas as formulações procurou-se manter um pH inicial em torno de 5,5 a 7,0, sendo esse o intervalo do pH cutâneo natural. Apenas a formulação em pomada apresentou pH inicial em torno de 4,0; o qual foi mantido (FARM. BRAS., 2010; PRISTA *et al.*, 2008).

4.8.1 Pomada

Pomada é uma forma farmacêutica semi-sólida, para aplicação na pele ou em membranas mucosas; que consiste da solução ou dispersão de uma ou mais substâncias ativas em baixas concentrações, em uma base usualmente não aquosa. Em geral, as pomadas são compostas por hidrocarbonetos líquidos numa matriz de hidrocarbonetos sólidos de elevado ponto de fusão (FARM. BRAS., 2010; LACHMAN *et al.*, 2001).

Para a formulação em pomada obteve-se dificuldade na incorporação do extrato liofilizado em ambas as concentrações utilizadas; pois o extrato possui natureza polar e a formulação em questão é altamente apolar. Com isso, os caracteres organolépticos foram prejudicados, apresentando aparência desuniforme desde o início do estudo de estabilidade; sendo assim, as amostras foram retiradas do estudo no tempo de 30 dias.

Ressalta-se, portanto, a necessidade de melhoramento da formulação com relação à homogeneidade. Adjuvantes técnicos como tensoativos e agentes emulsivos de baixo EHL seriam interessantes para a resolução do problema, pois facilitam a dispersão água em óleo (A/O). Dessa maneira haveria alteração da natureza da formulação, modificando a base da pomada para emulsão. Mudanças no veículo da formulação para bases hidrossolúveis, conhecidas como pomadas hidrofílicas, também poderiam ser avaliadas (PRISTA *et al.*, 2008).

4.8.1.1 Embalagem Plástica de Polipropileno

No quadro 5 e figuras 12 e 13 estão apresentados os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para a formulação em pomada placebo (PP), nas concentrações de 5 mg/g (P5) e 10 mg/g (P10); em embalagem de polipropileno (PIs); colocadas em condições de temperatura a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
PP ¹	0	Pomada amarela, homogênea, odor característico	
	30	Inalterado	Escurecimento da amostra
P5 ²	0	Pomada amarela escura, heterogênea (pequenos grumos), odor característico	
	30	Inalterado	Escurecimento da amostra
P10 ³	0	Pomada castanha, heterogênea (pequenos grumos), odor característico	
	30	Inalterado	Pomada castanha avermelhada, com separação dos constituintes

QUADRO 5 - CARACTERES FÍSICOS POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Pomada placebo; ²Pomada 5 mg/g; ³Pomada 10 mg/g

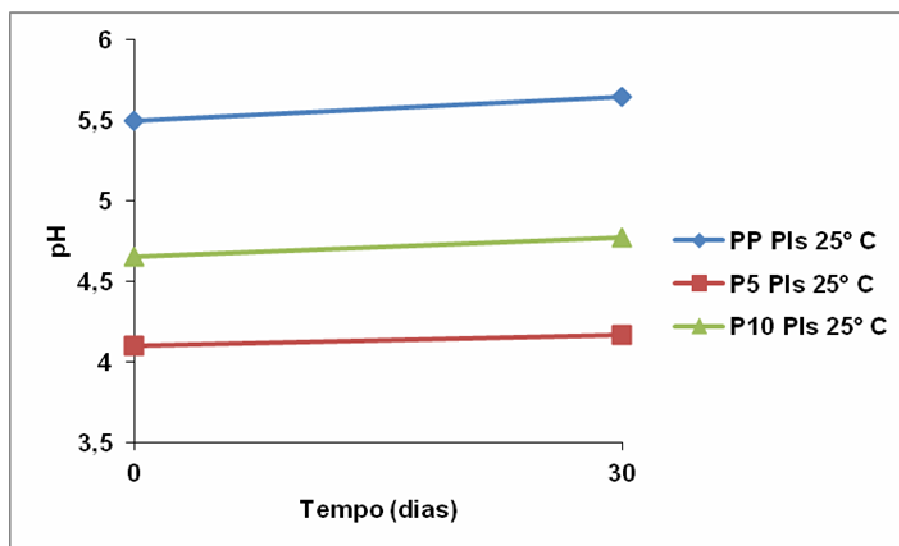


FIGURA 12 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C

NOTA: PP - Pomada placebo; P5 - Pomada 5 mg/g; P10 - Pomada 10 mg/g

FONTE: O autor (2011)

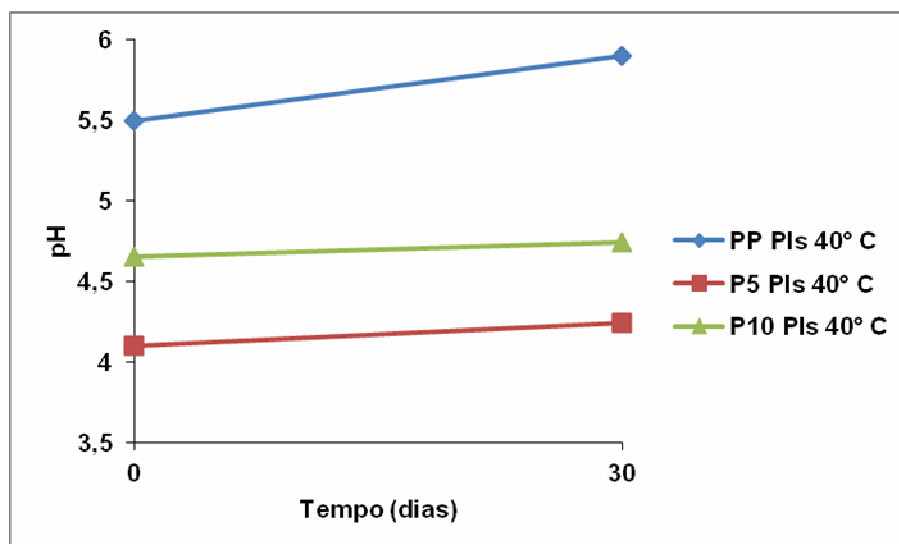


FIGURA 13 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C
 NOTA: PP - Pomada placebo; P5 - Pomada 5 mg/g; P10 - Pomada 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

De acordo com o quadro 5, nota-se que a embalagem plástica apresenta problemas em manter as formulações estáveis em temperaturas altas, apresentando alterações na coloração e separação dos constituintes para a amostra P10, com maior concentração de extrato.

Para a variação de pH a embalagem e formulação apresentam-se adequadas, observados nas figuras 12 e 13 a ocorrência de baixa variação para ambas as concentrações. Para a condição ambiente, manteve-se somente uma amostra de P5 e P10 até o tempo final do estudo, verificando os caracteres organolépticos e pH no tempo 180 dias. Os caracteres físicos mostraram-se inalterados e, a variação de pH foi mínima para ambas as amostras, sendo de 4,16 para a amostra P5 e de 4,48 para a amostra P10.

Observa-se que a amostra P5 apresentou valores de pH mais ácidos em comparação à amostra P10. Tal comportamento não era esperado, uma vez que o extrato liofilizado possui baixo valor de pH e sua maior adição refletiria maior acidez à formulação. Uma justificativa poderia ser a falta de homogeneidade visual observada nas amostras P5 e P10, com presença de grumos (partículas de extratos não solubilizados) desde o tempo zero.

Para a escolha do material de embalagem de qualquer produto, o ponto principal a ser determinado sob o ponto de vista farmacotécnico é se a embalagem

em questão, mantém a integridade do produto, protegendo-a das variações ambientais. (LACHMAN *et al.*, 2001).

Os recipientes de plástico apresentam algumas vantagens, como a resistência à quebra e facilidade de transporte. Polímeros como o polietileno, polipropileno, cloreto de polivinilo, poliestireno e outros são os mais utilizados para a sua fabricação (LACHMAN *et al.*, 2001).

Fatores como polímero de composição do plástico, processamento, procedimentos de limpeza, corantes, adesivos, absorção, adsorção, permeabilidade de conservantes e condições de armazenamento podem afetar a estabilidade de um plástico para determinado uso. Por isso a adequação dos materiais de embalagem em diferentes formulações deve ser estabelecida por meio de avaliações adequadas (LACHMAN *et al.*, 2001).

O polipropileno, presente na composição da embalagem, é um polímero de cadeia longa, sintetizado com o auxílio de catalisadores, sob condições controladas de calor e pressão. Apresenta uma alta resistência a produtos químicos; exceto solventes aromáticos e halogenados; alto ponto de fusão, sendo resistente a altas temperaturas; é inerte e possui custo reduzido. Dentre suas desvantagens estão: a falta de transparência, instabilidade frente a baixas temperaturas (tornando-se quebradiço) e elevada permeabilidade ao oxigênio. É um material de embalagem muito utilizado para medicamentos e cosméticos (FARM. BRAS., 2010; LACHMAN *et al.*, 2001).

O polietileno de baixa densidade, polímero do batoque utilizado, apresenta maleabilidade, transparência e determinada transmissão de vapor, sendo um material de baixa proteção, quando comparado ao polipropileno (FARM. BRAS., 2010; LACHMAN *et al.*, 2001).

Observa-se de acordo com o quadro 5 alterações dos caracteres físicos, com escurecimento das amostras. Tal fato pode ser devido à permeabilidade da embalagem utilizada, pois o polipropileno apresenta como uma de suas desvantagens a permeabilidade nas duas direções: ambiente interno e externo à embalagem (LACHMAN *et al.*, 2001).

Os potes de fundo falso utilizados apresentaram falhas na vedação do pote com a tampa, e o batoque utilizado não agregou proteção às amostras; podendo ser um agravante relacionado ao escurecimento das amostras colocadas a 40 °C. Essa barreira ineficiente pode ter permitido trocas entre o ambiente e a amostra; sendo tal

comportamento acelerado nas amostras submetidas à temperatura de 40 °C, nas quais o escurecimento é mais evidente.

4.8.1.2 Embalagem de Alumínio

No quadro 6 e figuras 14 e 15 estão apresentados os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para a formulação em pomada placebo (PP), 5 mg/g (P5) e 10 mg/g (P10); na embalagem de alumínio (Alu) colocadas a 25 °C \pm 2 °C e 40 °C \pm 2 °C.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
PP ¹	0	Pomada amarela, homogênea, odor característico	
	30	Inalterado	Leve escurecimento da amostra
P5 ²	0	Pomada amarela escura, heterogênea (pequenos grumos), odor característico	
	30	Inalterado	Leve escurecimento da amostra
P10 ³	0	Pomada castanha, heterogênea (pequenos grumos), odor característico	
	30	Inalterado	Pomada castanha avermelhada

QUADRO 6 - CARACTERES FÍSICOS POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C

FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Pomada placebo; ²Pomada 5 mg/g; ³Pomada 10 mg/g

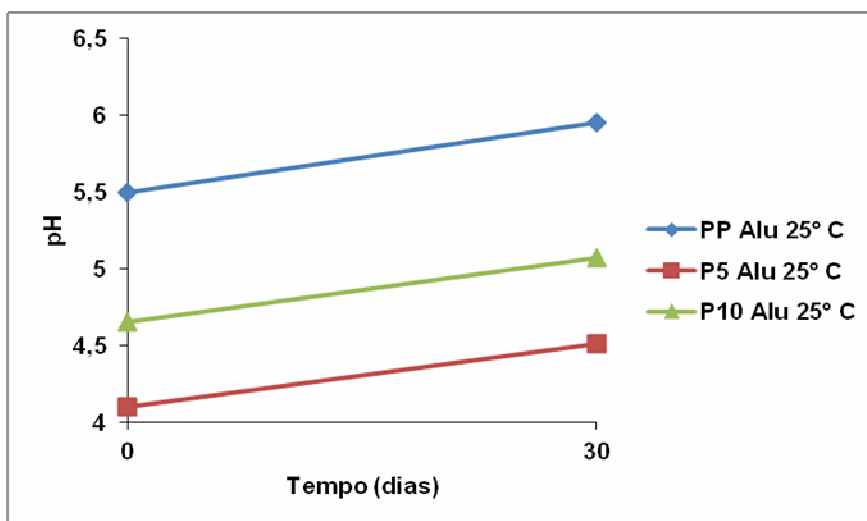


FIGURA 14 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C
 NOTA: PP - Pomada placebo; P5 - Pomada 5 mg/g; P10 - Pomada 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

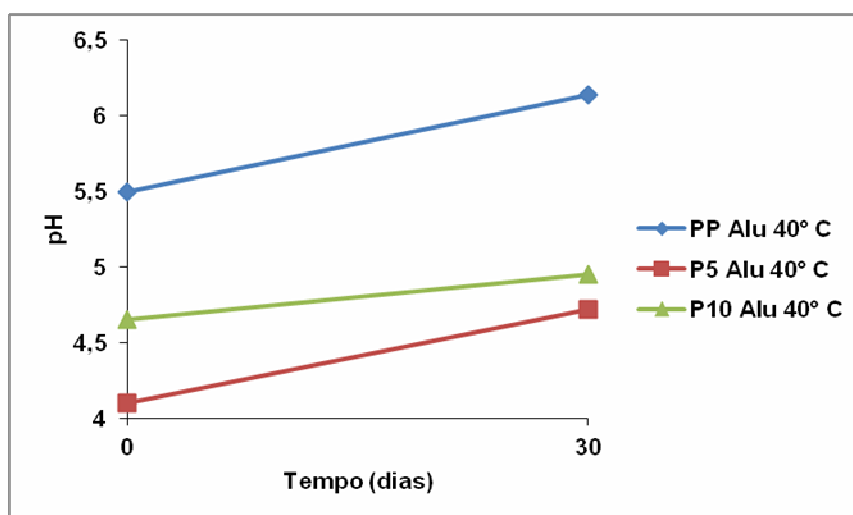


FIGURA 15 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DA POMADA EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C
 NOTA: PP - Pomada placebo; P5 - Pomada 5 mg/g; P10 - Pomada 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

Para a embalagem de alumínio observa-se que não ocorre o problema de separação dos constituintes na amostra P10, em comparação à embalagem plástica. A condição 25 °C se apresentou satisfatória para as análises; a condição 40 °C somente apresentou um leve escurecimento das amostras, menos agravante do que o observado para as amostras em embalagem plástica de polipropileno.

A variação de pH foi crescente, porém com intervalo mínimo e sem nenhuma degradação aparente nas amostras.

Embalagens do tipo bisnaga de alumínio possuem adequada proteção do produto, boa vedação da embalagem com a tampa, peso reduzido, facilidade no transporte e baixo custo. A presença de revestimento interno é um atrativo para minimizar ou anular possíveis interações da embalagem com o produto, sendo vantajoso mesmo com aumento no custo do material. Uma desvantagem aparente é a suscetibilidade à deformação física dessas embalagens durante o transporte e uso do produto (LACHMAN *et al.*, 2001).

4.8.2 GEL HIDROFÍLICO

É uma forma farmacêutica semi-sólida, predominantemente aquosa, que contém um agente geleificante que fornece firmeza a uma preparação. Diz-se que são sistemas semi-sólidos em que uma fase líquida está confinada dentro de uma matriz polimérica tridimensional (FARM. BRAS., 2010; LACHMAN *et al.*, 2001).

4.8.2.1 Embalagem Plástica de Polipropileno

A mesma embalagem plástica utilizada para o acondicionamento da pomada foi utilizada para as demais formulações (gel e creme).

Os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para a formulação em gel placebo (GP), nas concentrações de 5 mg/g (G5) e 10 mg/g (G10); em embalagem plástica de polipropileno (PIs); colocadas em condições de temperatura a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, estão descritos no quadro 7 e figuras 16 e 17.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
GP ¹	0	Gel transparente, consistente, homogêneo, odor característico	
	7	Inalterado	Inalterado
	14		Leve separação de constituintes
	30		
	180		*
G5 ²	0	Gel castanho, consistente, homogêneo, odor característico	
	7	Inalterado	Leve separação de constituintes, forte presença de grumos
	14		
	30		
	180		*
G10 ³	0	Gel castanho escuro, consistente, homogêneo, odor característico	
	7	Inalterado	Leve separação de constituintes, forte presença de grumos
	14		
	30		
	180		*

QUADRO 7 - CARACTERES FÍSICOS GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C

FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Gel placebo; ²Gel 5 mg/g; ³Gel 10 mg/g; *Amostras retiradas da avaliação preliminar.

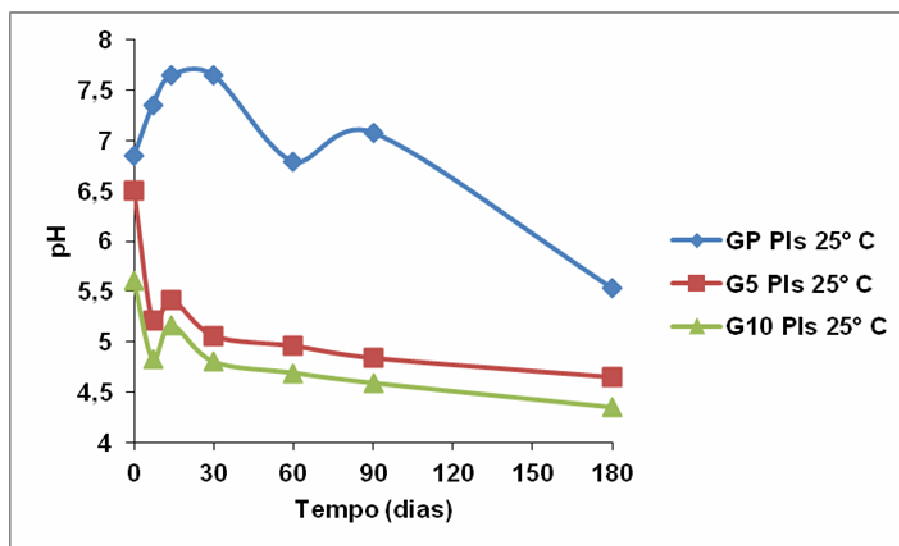


FIGURA 16 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C
 NOTA: GP - Gel placebo; G5 - Gel 5 mg/g; G10 - Gel 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

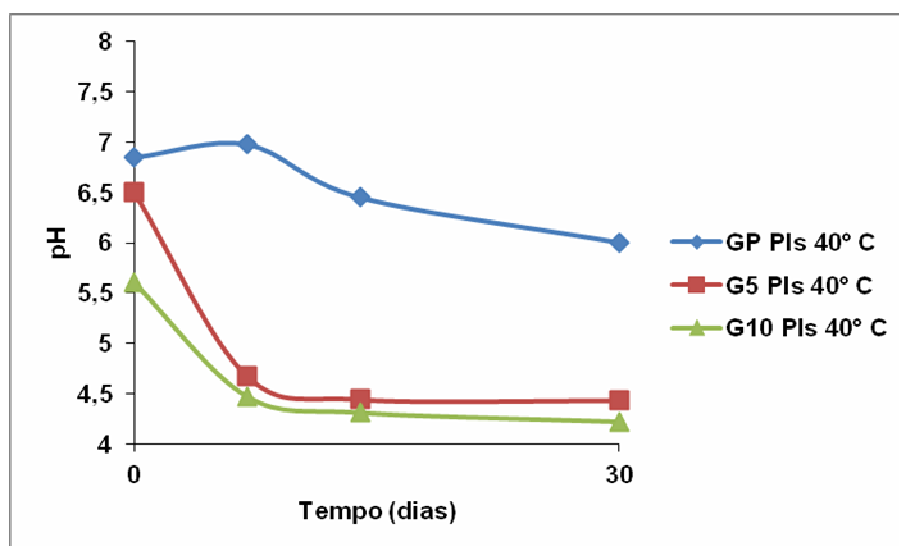


FIGURA 17 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C
 NOTA: GP - Gel placebo; G5 - Gel 5 mg/g; G10 - Gel 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

Na condição ambiente os caracteres físicos não sofreram alteração até o último tempo de estudo (180 dias); porém na condição 40 °C, a partir do 14° dia observou-se separação de constituintes para a formulação controle GP, e a partir do 7º dia para as amostras G5 e G10, as quais apresentaram grumos.

Da mesma forma que na apresentação pomada a embalagem em polipropileno permitiu trocas entre o ambiente e a amostra; não propiciando a barreira protetora esperada. Este comportamento foi acelerado nas amostras submetidas à temperatura de 40 °C, onde se observa no quadro 7 alterações nos caracteres visuais (separação de fases e aparecimento de grumos). A passagem de vapores, com possível perda de água da formulação para o ambiente, pode ter ocorrido para a apresentação gel, formulação altamente hidrofílica. Além disso, os potes de fundo falso utilizados apresentaram falhas na vedação do pote com a tampa, e o batoque utilizado não agregou proteção às amostras (LACHMAN *et al.*, 2001).

Com relação ao pH, nota-se um perfil semelhante entre as amostras G5 e G10, inclusive nas duas condições de armazenamento. Também se observa que, devido ao caráter ácido do extrato liofilizado e à boa homogeneidade deste com o veículo, quanto maior a concentração adicionada na formulação, mais ácido apresenta-se o pH. Para as amostras G5 e G10 colocadas em temperatura estressante nota-se uma nítida queda de pH em um intervalo curto de tempo, principalmente no início do estudo.

Devido às alterações apresentadas por todas as amostras na temperatura de 40 °C finalizou-se a avaliação das amostras GP, G5 e G10, em embalagem plástica de polipropileno após 30 dias. As amostras na condição de 25 °C foram mantidas até o tempo proposto (180 dias).

4.8.2.2 Embalagem de Alumínio

A mesma embalagem de alumínio utilizada para o acondicionamento da pomada foi utilizada para as demais formulações (gel e creme).

Os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para a formulação em gel placebo (GP), 5 mg/g (G5) e 10 mg/g (G10); na embalagem de alumínio (Alu), colocadas em 25 °C \pm 2 °C e 40 °C \pm 2 °C, são descritos no quadro 8 e figuras 18 e 19.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
GP ¹	0	Gel transparente, consistente, homogêneo, odor característico	
	180	Inalterado	
G5 ²	0	Gel castanho, consistente, homogêneo, odor característico	
	90	Inalterado	Presença de poucos grumos
	180		
G10 ³	0	Gel castanho escuro, consistente, homogêneo, odor característico	
	90	Inalterado	Presença de poucos grumos
	180		

QUADRO 8 - CARACTERES FÍSICOS GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C

FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Gel placebo; ²Gel 5 mg/g; ³Gel 10 mg/g

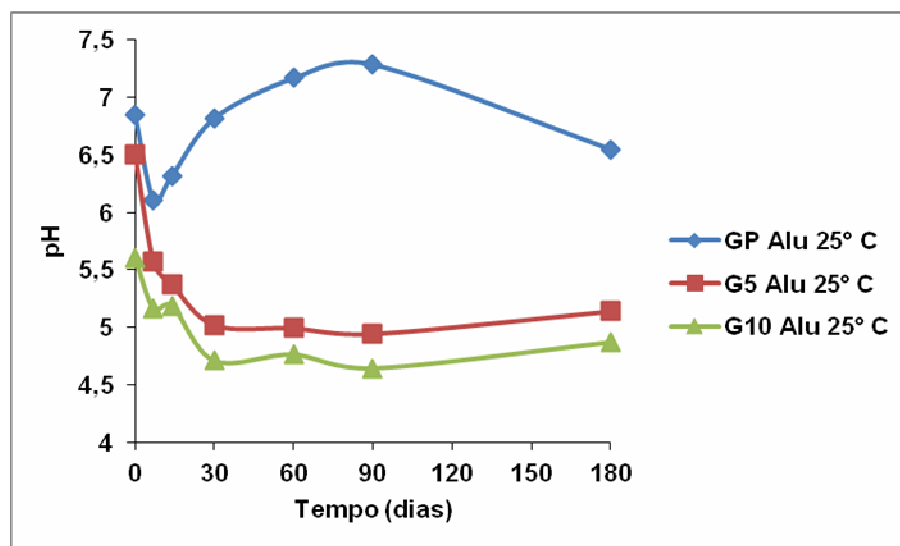


FIGURA 18 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C

NOTA: GP - Gel placebo; G5 - Gel 5 mg/g; G10 - Gel 10 mg/g

FONTE: O autor (2011)

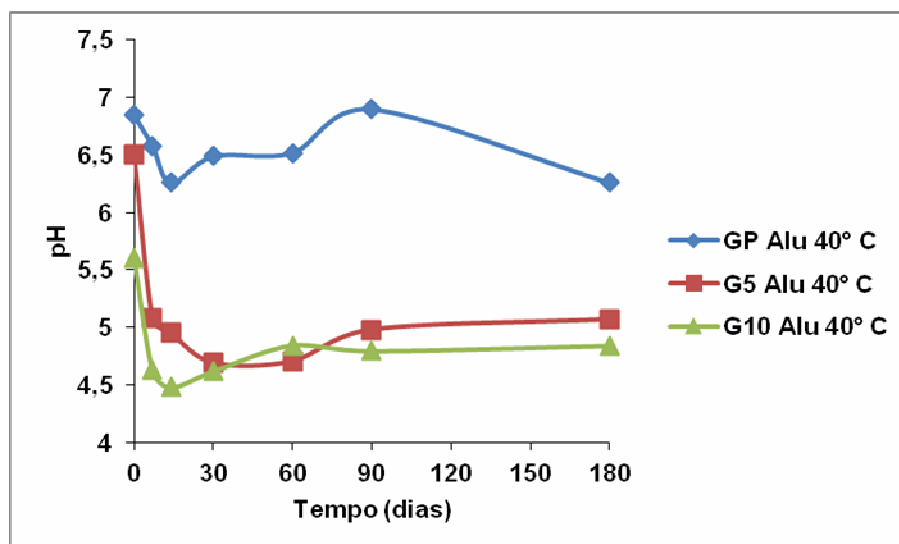


FIGURA 19 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO GEL EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C
 NOTA: GP - Gel placebo; G5 - Gel 5 mg/g; G10 - Gel 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

Nota-se, de acordo com o quadro 8, que a embalagem de alumínio forneceu às formulações em gel condições de maior estabilidade frente às embalagens plásticas. Não foram observados problemas de separação de constituintes e presença marcante de grumos. Na temperatura de 25 °C os caracteres físicos mantiveram-se inalterados. Na temperatura de 40 °C, a partir de 90 dias, foram visualizadas alterações na aparência, detectando-se pequenos grumos nas formulações G5 e G10, exceto o controle.

Para as duas condições de armazenamento a variação de pH foi menor quando comparada à embalagem plástica. Conforme exibido pelas formulações em embalagem plástica, o perfil das amostras G5 e G10 foram semelhantes, com aumento do caráter ácido para a maior concentração de extrato.

Da mesma maneira que a pomada, as formulações em gel armazenadas em bisnaga de alumínio apresentaram variações mínimas nas análises relatadas.

4.8.3 Creme

Creme é uma forma farmacêutica semi-sólida que consiste de uma emulsão, formada por uma fase lipofílica, uma fase hidrofílica e um tensoativo. É constituída de uma fase interna, dispersa ou descontínua, rodeada de uma fase externa,

dispersante ou contínua, estabilizada por um agente tensoativo (FARM. BRAS., 2010; PRISTA *et al.*, 2008).

4.8.3.1 Embalagem Plástica de Polipropileno

No quadro 9 e figuras 20 e 21, estão representados os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para as amostras formuladas em creme placebo (CP), 5 mg/g (C5) e 10 mg/g (C10); em embalagem plástica de polipropileno (PIs), colocadas em $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
CP ¹	0	Creme branco, brilhante, consistente, homogêneo	
	7	Inalterado	Leve película na superfície da emulsão, leve separação de fases
	14		
	30		
	180		*
C5 ²	0	Creme caramelo claro, brilhante, consistente, homogêneo	
	7	Inalterado	Película dura e escurecida na superfície da emulsão, leve separação de fases
	14		
	30		
	180		*
C10 ³	0	Creme caramelo escuro, brilhante, consistente, homogêneo	
	7	Inalterado	Película dura e escurecida na superfície da emulsão, leve separação de fases
	14		
	30		
	180		*

QUADRO 9 - CARACTERES FÍSICOS CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C E 40 °C

FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Creme placebo; ²Creme 5 mg/g; ³Creme 10 mg/g, *Amostras retiradas da avaliação preliminar.

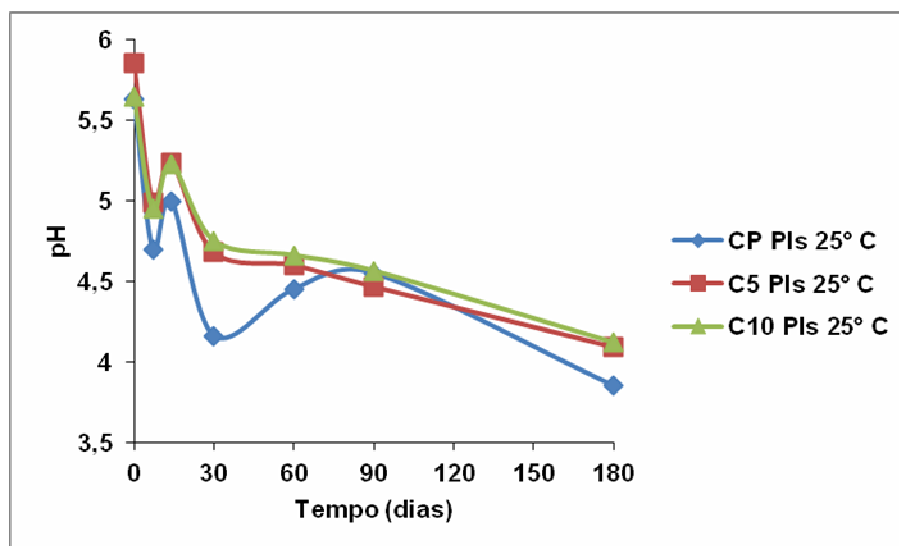


FIGURA 20 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 25 °C
 NOTA: CP - Creme placebo; C5 - Creme 5 mg/g; C10 - Creme 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

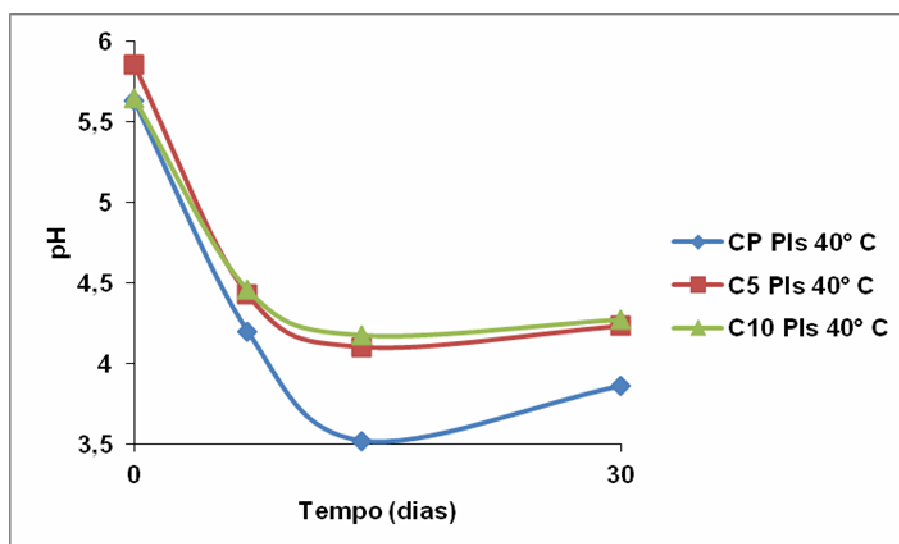


FIGURA 21 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM PLÁSTICA (PLS); 40 °C
 NOTA: CP - Creme placebo; C5 - Creme 5 mg/g; C10 - Creme 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

Os caracteres físicos (Quadro 9) em condição 25 °C não sofreram alteração, porém na temperatura 40 °C, as amostras apresentaram perda de água na formulação (presença de película) e leve separação de fases para todas as amostras, incluindo o controle (CP). Nota-se nas amostras C5 e C10 a formação de uma rígida crosta sobre a superfície da formulação, a qual aparece a partir do 7º dia, sendo todas as amostras nessa condição retiradas da avaliação após 30 dias.

Novamente fica evidente a instabilidade das formulações armazenadas na embalagem plástica de polipropileno, a qual não exerceu um efeito de barreira eficiente entre o ambiente interno e externo. Ocorreu a queda de pH em pouco tempo de armazenamento, indicando a instabilidade da formulação nesta embalagem. As amostras C5 e C10 demonstraram perfil semelhante na análise de pH.

4.8.3.2 Embalagem de Alumínio

São apresentados, no quadro 10 e figuras 22 e 23, os resultados da avaliação preliminar do comportamento físico para as amostras formuladas em creme placebo (CP), 5 mg/g (C5) e 10 mg/g (C10); em embalagem de alumínio (Alu), colocadas em $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras	Tempo (dias)	Caracteres físicos	
		25 °C	40 °C
CP ¹	0	Creme branco, brilhante, consistente, homogêneo	
	180	Inalterado	
C5 ²	0	Creme caramelo claro, brilhante, consistente, homogêneo	
	60	Inalterado	Presença de poucos grumos
	90		
	180		
C10 ³	0	Creme caramelo escuro, brilhante, consistente, homogêneo	
	60	Inalterado	Presença de poucos grumos
	90		
	180		

QUADRO 10 - CARACTERES FÍSICOS CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C E 40 °C
FONTE: O autor (2011)

NOTA: ¹Creme placebo; ²Creme 5 mg/g; ³Creme 10 mg/g,

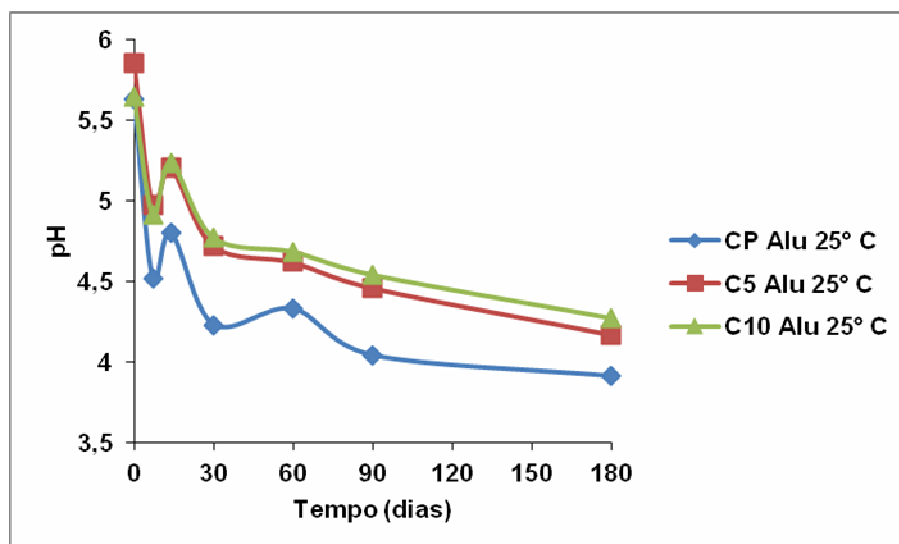


FIGURA 22 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 25 °C
 NOTA: CP - Creme placebo; C5 - Creme 5 mg/g; C10 - Creme 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

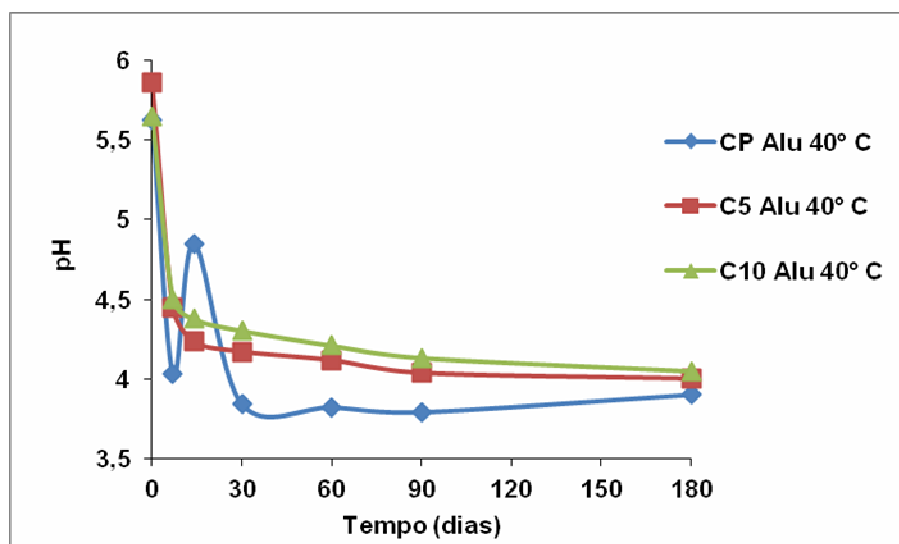


FIGURA 23 - GRÁFICO VARIAÇÃO DE pH DO CREME EM EMBALAGEM ALUMÍNIO (ALU); 40 °C
 NOTA: CP - Creme placebo; C5 - Creme 5 mg/g; C10 - Creme 10 mg/g
 FONTE: O autor (2011)

Conforme o quadro 10, a amostra controle (CP) permaneceu com aspecto estável quando armazenada em embalagem de alumínio. Na condição 25 °C as amostras C5 e C10 apresentaram-se inalteradas, e na temperatura de 40 °C apresentaram leve tendência à formação de grumos a partir do dia 60.

Na variação de pH as amostras C5 e C10 apresentaram leituras bem próximas durante todo o estudo, sendo observado na formulação em creme o perfil

de pH mais semelhante entre as amostras com extrato. Todas as amostras tiveram queda de pH, sendo esse fato mais evidente nos primeiros dias do estudo.

5 CONCLUSÕES

Pelas análises desenvolvidas nas cascas de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp., pode-se concluir:

Os extratos aquoso e hidroalcoólico e as frações F1, F2, F3, F4 e F5 analisados possibilitaram à confirmação da composição química das cascas de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp.

As extrações alcalinas das amostras PMK2 e PMK10 das frações extrativas de polissacarídeos apresentaram maior rendimento em g%.

A presença de açúcares totais nas amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 foi representativa, apresentando valores próximos ou superiores a 50 %.

A presença de arabinose e xilose como monossacarídeos majoritários foram detectadas para a amostra PMAQ, podendo estar na forma de arabinoxilanas no material vegetal.

A presença de xilose, arabinose e glucose como monossacarídeos majoritários foram detectadas para a amostra PMK10, podendo estar na forma de xilanas, arabinoxilanas e xiloglucanas no material vegetal.

A maior concentração do ácido urônico foi observada na amostra PMAQ (11,22 %), seguida de PMK2 e PMK10.

As amostras PMAQ, PMK2 e PMK10 apresentaram-se heterogêneas na análise de homogeneidade.

Os valores encontrados na composição fenólica (1,27g%) e de taninos totais (3,41g% com reagente Folin-Denis e 0,66 g% com o reagente Folin-Ciocalteu) foram considerados abaixo do esperado.

Com os extratos liofilizados foram produzidas formulações em pomada, gel e creme; as quais devem ser melhoradas para obtenção de melhor homogeneidade e maior estabilidade de pH.

Na avaliação preliminar apenas a embalagem de alumínio foi considerada satisfatória, podendo ser submetida a estudos de estabilidade completos que venham a comprovar sua possível utilização como sistema de embalagem para as formulações desenvolvidas.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Isolamento e identificação dos metabólitos secundários mais abundantes na casca do material vegetal, como taninos, aminogrupos e esteróides/triterpenos;
- Aplicação de técnicas de purificação para polissacarídeos e análises de homogeneidade e composição monossacarídica para as amostras PMK2 e PMK10;
- Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono e prótons para as amostras PMAQ, PMK2 e PMK10;
- Dosagem de proteínas totais para a amostra liofilizada obtida da extração MeOH:H₂O (2:1);
- Determinação de água do material vegetal e repetição da dosagem de taninos totais com uso do reagente Folin-Ciocalteu;
- Melhoramento das formulações em pomada e creme a fim de se obter melhor homogeneidade e maior estabilidade de pH, respectivamente.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medicamentos fitoterápicos. 28 set. 2007a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos?cat=Medicamentos+fitoterapicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F688d6f804f6be547af47bfc894994279%2FPUBLISHED&con=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F47930180402ca29db76fb754e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Medicamentos&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Publicacao+Medicamentos/Medicamentos+fitoterapicos. Acesso em: 29/5/2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medicamentos fitoterápicos. GMEFH/GGMED/ANVISA. 28 set. 2007b. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/aec9eb00402ccf9abeaabe54e035b7cb/medicamentos_fitoterapicos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 29/5/2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Vol 1. Mai 2004. 52 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf> Acesso em: 03/10/2011.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G. ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica - formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000.

BATISTA, A. N. L. de; JUNIOR, J. M. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. da. Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 321-323, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000200017&script=sci_arttext. Acesso em: 05/05/2010.

BRASIL. Resolução no. 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf. Acesso em: 10/04/2011.

BRASIL. Portaria n. 971, de 03 de maio de 2006. Dispõe e aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html. Acesso em: 30/5/2010.

CIPRIANI, T. C. **Extração, purificação e caracterização estrutural de polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinaheira-santa)**. 81p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CIPRIANI, T. C. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinaheira-santa) com atividade gastroprotetora**. 78 p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

COSMO, S. A.; MAYER, B.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. **Braz. J. Pharm.**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 533-537, Out./Dez. 2007. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=476201&indexSearch=ID>>. Acesso em: 05/05/2010.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5ª ed. Lisboa: Editora Fundação Caloute Gulbenkian, 2002, v. II.

COSTA, R. S. da. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 3ª ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

CUNHA, da, P. L. R.; PAULA, de, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

CUNHA, A. P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3ª ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

DETERS, A.; DAUER A.; SCHNETZ, E.; FARTASCH, M.; HENSEL, A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation

and influence on irritated skin. **Phytochem.**, v. 58, p. 949–958, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684194>>. Acesso em: 26/10/2011.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. v. I. São Paulo: Editora Atheneu São Paulo Ltda, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. v 2. Brasília: Editora Fio Cruz, 2010.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem**, v. 197, p. 157-162, 1991.

GOGIA, P. P. Feridas - **Tratamento e Cicatrização**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2003.

GOWDA, C. D.; SARATHY, C.; RAJU, T. S. Structural investigations on the mucilaginous polysaccharides isolated from bark of the avocado tree (*Persea americana* Mill.) **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 177, p. 117-125, 1988. Disponível em: <http://www.avocadosource.com/journals/elsevier/carbres_1988_177_117-125.pdf>. Acesso em: 22/06/2010.

GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HESS, C. T. **Tratamento de feridas e úlceras**. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editora, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1997.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. V. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Journ. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265, 1951.

LUIJENDIJK, T. J. C. 2000 Years of Natural Products Research - Past, Present **and Future**. The Netherlands: Phytoconsult, 2000.

MA, W. W.; ANDERSON, J. E.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Majorenolide and majorynolide: a new pair of cytotoxic and pesticidal alkene-alkyne delta-lactones from *Persea major*. **J. Nat. Prod**, Washington, v. 53, suppl. 6, 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 06/05/2010.

MALAFAIA, O.; CAMPOS, A. C. L.; TORRES, O.; GOLDENBERG, S. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 21, suppl. 3, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502006000900001&script=sci_arttext>. Acesso em: 10/11/2010.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* LABILL. subespécie *bicostata* (MAIDEN et al.) J.B. kirkpat., Myrtaceae.** 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARANHO, L. T. **Contribuição ao estudo botânico, fitoquímico, farmacológico e microbiológico de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp (Lauraceae).** 85 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

MARANHO, L. T.; PREUSSLER, K. H.; ROCHA, L. D. Organização estrutural da casca de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp (Lauraceae). **Acta bot. Bras.**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 509-515, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062009000200022>. Acesso em: 05/05/2010.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos de *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra).** 75 p. Dissertação (Mestre em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra).** 139 p. Tese (Doutorado em

Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MELLO, R. A. de. **Atividade antimicrobiana do extrato bruto da casca de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp (LAURACEAE)**. VII SEMINÁRIO DE PESQUISA – PESQUISA E PROMOÇÃO HUMANA. Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Trib. Farm.**, v. 47, n. 9, p. 1-19, 1979. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0102-695X200300040000100009&pid=S0102-695X2003000400001&lng=en>>. Acesso em: 05/05/2010.

MORETONI, C. B. **Avaliação fitoquímica e das atividades antioxidante, citotóxica e hipoglicemiante dos frutos de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes & solventes. Padronização, preparação, purificação**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1990.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M.; PAROUL, N.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J.V. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Brazil J. Biol.**, Rio Grande do Sul, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/v69n2/15.pdf>>. Acesso em: 05/05/2010.

NAKASHIMA, T. **Fitoquímica experimental**. Apostila prática do curso de Farmácia (Disciplina de Fitoquímica), 25p - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

OLIVEIRA, C. W. de; CALADO, C. H.; MARQUETE, O. Anatomia do lenho de espécies do gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae). **Rodrig.**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 81, p. 125-134, 2001. Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/Rodrig52_81/7-oliv~1.pdf>. Acesso em: 20/05/2010.

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* CAMB., CARYOCARACEAE.** 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia farmacêutica.** 7ª ed, v. I. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB008517>).>. Acesso em: 01/11/2011.

SILVA da, A. W. C. Fotos. Curitiba, PR, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P de V. M.; AULER, L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed da UFSC, 2010.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Jour. of Ethnopharm.**, v.122, p. 523-532, 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jethpharm>. Acesso em: 12/06/2011.

TRÓPICOS®. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/17803395>>. Acesso em: 21/11/2011.

VALE, J. R. de.; CZECZKO, N. G.; AQUINO, J. U.; RIBAS-FILHO, J. M.; BETTEGA, L.; VASCONCELOS, de., P. R. L.; NETO, M. A. C.; NASSIF, P. A. N.; MAZZA, M.; HENRIQUES, G. S. Comparative study of the healing process of gastrorrhaphies with and without the use of *Jatropha gossypifolia* L. (bellyache bush) extract in rats. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 21, suppl. 3, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000900007>. Acesso em: 02/12/2010.

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados de polivinilpirrolidona.** 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WU, S. J.; NG, L. T. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. **LWT - Food Sc. Techn.**, Oxford, v.41, p.323-330, 2008. Disponível em: <<http://ntur.lib.ntu.edu.tw/bitstream/246246/176819/1/24.pdf>>. Acesso em: 20/05/2010.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.